

ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

UNIVERSITÄT HAMBURG LIBRARY
JUN 24 '64

BEGRÜNDET VON
J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

HERAUSGEGEBEN VON

H. L. JENSEN LYNGBY	C. B. VAN NIEL PACIFIC GROVE	R. NILSSON UPPSALA
G. PIEKARSKI BONN	E. G. PRINGSHEIM GÖTTINGEN vorm. CAMBRIDGE	W. H. SCHOPFER BERN
H. TAMIYA TOKIO	T. WIKÉN DELFT	

UND DEN SCHRIFTFLEITERN

A. RIPPEL-BALDES GÖTTINGEN	R. HARDER GÖTTINGEN
-------------------------------	------------------------

32. BAND · 4. (SCHLUSS-)HEFT

MIT 63 TEXTABBILDUNGEN
(ABGESCHLOSSEN AM 24. MÄRZ 1959)



Per.
QR 1
Ar 25

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1959

Archiv für Mikrobiologie

Zeitschrift für die Erforschung der pflanzlichen Mikroorganismen. Begründet 1930 von
J. Behrens, F. Boas, A. Rippel. Berlin, Springer

Das „Archiv für Mikrobiologie“ steht Originalarbeiten und Sammelreferaten aus dem Gesamtgebiet der pflanzlichen Mikroorganismen offen. Arbeiten, die nur praktischen Zwecken dienen, scheiden aus, während im übrigen alle wissenschaftlichen Fragen aus „reinen“ und „angewandten“ Gebieten berücksichtigt werden.

Das „Archiv“ erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials. Der Preis des Bandes beträgt DM 96,—.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20,— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 30,— für eine Arbeit. Sammelreferate werden mit DM 40,— für den Druckbogen honoriert.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotos u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Manuskripte erbeten an:

Prof. Dr. H. L. Jensen, Lyngby/Dänemark, Statens Planteavlslaboratorium, Bakteriologisk Afdeling,

Prof. Dr. C. B. van Niel, California/USA, Pacific Grove, Stanford University, Hopkins Marine Station,

Prof. Dr. R. Nilsson, Uppsala 7/Schweden, Kungl. Lantbrukshögskolan, Mikrobiologiska Institutionen,

Prof. Dr. G. Piekarski, Bonn/Rh., Venusberg, Hygienisches Institut, medizinisch-parasitologische Abteilung, der Universität,

Prof. Dr. E. G. Pringsheim, Göttingen, Nikolausbergerweg 18, Pflanzenphysiologisches Institut,

Prof. Dr. W. H. Schopfer, Bern/Schweiz, Botanisches Institut der Universität,

Prof. Dr. H. Tamiya, Tokio/Japan, 41, Mejiro-Machi 4th St., The Tokuwaga Institute for Biological Research,

Prof. Dr. T. Wikén, Delft/Holland, Julianalaan 67 A, Laboratorium voor Microbiologie, Technische Hogeschool

oder an die

Schriftleitung:

Prof. Dr. A. Rippel-Baldes, Göttingen, Albrechtstraße 6,

Prof. Dr. R. Harder, Göttingen, Pflanzenphysiologisches Institut, Untere Karspüle 2

Springer-Verlag

Berlin · Göttingen · Heidelberg

32. Band

Inhaltsverzeichnis

4. (Schluß)-Heft

	Seite
BÜNNING, E., und INGEBORG GÖSSEL, Ergänzende Versuche über die phototaktischen Aktionspektren von Euglena. Mit 2 Textabbildungen	319
WAHLIG, H., Properdin-System und Antikörperbildung. II. Der Serum-Properdin Spiegel von Kaninchen während der Immunisierung mit Salmonella typhosa. Mit 3 Textabbildungen	322
TROLLDENIER, G., Polyploidie und Knöllchenbildung bei Leguminosen. Mit 11 Textabbildungen	328
ROSEMBERG, J. A., Qualche ricerche intorno a Pichia fermentans Lodder. Con 1 figura nel testo	346
LEEDALE, G. F., The Time-Scale of Mitosis in the Euglenineae	352
GILLISSEN, G., und E. HEUSEL, Der Einfluß von Antibiotica auf die Überlebensrate von Mikroorganismen bei tiefen Temperaturen. Mit 2 Textabbildungen	361
BAHADUR, K., and S. RANGANAYAKI, The Influence of Iron, Sulphite and Paraformaldehyde on the Formation of 2.3 Butanediole in the Cultures of Bacillus polymyxa	369
OTTO, G., Beitrag zur Frage der funktionellen Bedeutung der Vesikel der endotrophen Mycorrhiza an Sämlingen von Malus communis L. Mit 19 Textabbildungen	373
BLASCHKE-HELLMESSEN, RENATE, Über die antagonistische Wirkung aerober Sporenbildner gegenüber pathogenen Hautpilzen. Mit 8 Textabbildungen	393
TOTH, L. Z. J., The Sterilizing Effect of Ethylene Oxide Vapor on Different Micro-Organisms. With 1 Figure in the text	408
PERSIEL, INGETRAUD, Über Phlyctochytrium reinboldtae n. sp. Mit 1 Textabbildung	411
PAUL, H. L., Spektralphotometrische Untersuchungen am Kartoffel-X-Virus. Mit 5 Textabbildungen	416
RAU, W., und C. ZEHENDER, Die Carotinoide von Fusarium aquaeductuum Lagh. Mit 3 Textabbildungen	423
PRINGSHEIM, E. G., Kleine Mitteilungen über Flagellaten und Algen. V. Gonium quadratum nov. sp. Mit 7 Textabbildungen	423
Autorenverzeichnis	438

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen)

Ergänzende Versuche über die phototaktischen Aktionsspektren von *Euglena*

Von
ERWIN BÜNNING und INGEBORG GÖSSEL

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. Oktober 1958)

In einer kürzlich erschienenen Arbeit berichtet HALLDAL über Aktionspektren der Phototaxis einiger Algen. Bei den untersuchten *Volvocales* war der Bereich um 493 m μ am wirksamsten, ein schwacher Nebengipfel trat bei 435 m μ auf. Für die Phototaxis der *Ulva*-Gameten war dieser

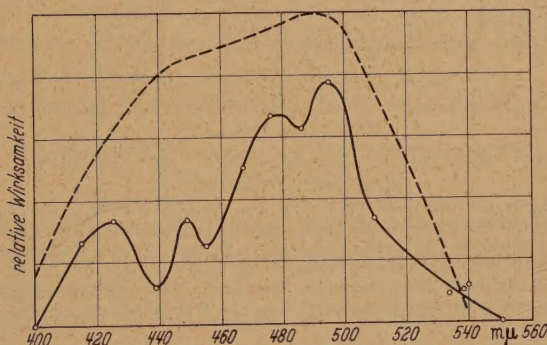


Abb. 1. Aktionsspektren der positiven Phototaxis von *Euglena gracilis* (nach BÜNNING u. SCHNEIDERHÖHN, ausgezogene Kurve) sowie von *Dunaliella* (nach HALLDAL, gestrichelte Kurve). Hinsichtlich der absoluten Höhe der Empfindlichkeit für die einzelnen Wellenlängen sind die beiden Kurven nicht miteinander vergleichbar

Nebengipfel ebenfalls nachweisbar, das Hauptmaximum lag hier bei 485 m μ .

Diese Aktionsspektren sind recht ähnlich den von uns (BÜNNING u. SCHNEIDERHÖHN 1956) für *Euglena* festgestellten. Wir fanden das Hauptmaximum bei etwa 495 m μ , ein Nebenmaximum bei ungefähr 425 m μ (Abb. 1).

Abweichend sind die Ergebnisse HALLDALS (1958) für die negative Phototaxis; er fand nämlich bei seinen Objekten keinen Unterschied gegenüber dem Aktionsspektrum der positiven Phototaxis, während wir eine deutliche Verschiedenheit gemessen hatten. Inzwischen haben wir hierzu noch einige Ergebnisse erzielt, die uns gerade im Hinblick auf diese Verschiedenheit mitteilenswert erscheinen.

Wir haben früher die (schon alte und von verschiedenen Autoren begründete) Annahme vertreten und näher begründet, daß die eigentlich wirksame, d. h. zu einer photochemischen Reaktion führende Strahlungsabsorption im Photoreceptor erfolgt und der Augenfleck nur als Organ zur Verdunklung des Photoreceptors dient. Dieser Auffassung stimmt auch HALLDAL zu. Wir haben nun weiter die Ansicht begründet, daß im Aktionsspektrum der negativen Phototaxis das Absorptionsspektrum

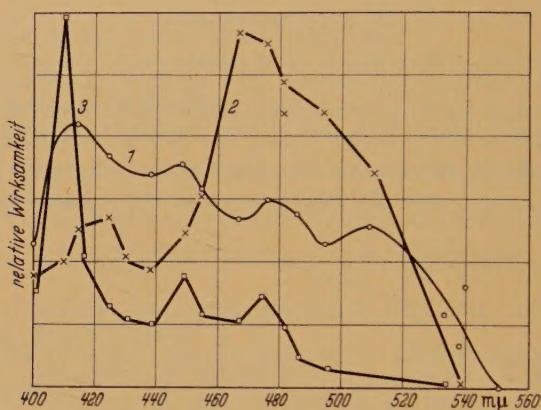


Abb. 2. Aktionsspektren der negativen Phototaxis von *Euglena gracilis* unter verschiedenen Bedingungen. Die einzelnen Kurven sind auch hier hinsichtlich der absoluten Höhe der Empfindlichkeit nicht miteinander vergleichbar. Berücksichtigt sind: 1 Messung für die Normalform (chlorophyllhaltig, nach BÜNNING u. SCHNEIDERHÖHN), 2 längere Zeit an Licht adaptierte Zellen der Normalform (der zusätzliche, nicht in die Kurve einbezogene Wert in der Nähe von 480 mμ ergibt sich bei der Berücksichtigung einer zweifelhaften Messung), 3 Form ohne Chlorophyll, mit Augenfleck (nach GÖSSEL)

der entscheidenden Substanz im Photoreceptor reiner zum Ausdruck kommt als im Aktionsspektrum der positiven Phototaxis. In dieser Ansicht hat uns nicht nur das unterschiedliche Reaktionsverhalten bei positiven und negativen Bewegungen bestärkt (BÜNNING u. TAZAWA 1957), sondern auch die Aktionsspektren chlorophyllfreier oder gar augenfleckfreier Euglenen (GÖSSEL 1957). Bei der Untersuchung dieser nichtgrünen Formen zeigte sich nämlich ein sehr ausgeprägtes Maximum bei 410 mμ und eine noch viel geringere relative Wirksamkeit der übrigen Bereiche als bei der negativen Phototaxis grüner und augenfleckführender Euglenen. Der Gipfel um 410 mμ war für die negative Phototaxis der grünen Form seinerzeit nicht gefunden worden; diese Wellenlänge hatten wir auch gar nicht geprüft, weil sie uns damals nicht beachtenswert erschien.

Jene Ergebnisse über die Aktionsspektren der farblosen Form mit oder ohne Augenfleck ließen es uns aber wünschenswert erscheinen,

den Bereich um $410\text{ m}\mu$ auch noch für die negative Phototaxis grüner Formen zu prüfen, um das früher mitgeteilte Aktionsspektrum ergänzen zu können.

Die Methodik glich der unserer früheren Mitteilungen (BÜNNING u. SCHNEIDERHÖHN 1956, GÖSSEL 1957). Benutzt wurde die Normalform von *Euglena gracilis*, mit der wir ebenfalls früher gearbeitet hatten.

Bei dieser Untersuchung ergab sich nun, daß der Gipfel um $410\text{ m}\mu$ bei der negativen Phototaxis tatsächlich eintreten kann, jedoch nur dann, wenn die Euglenen vorher 6–12 Std im Dunkeln gestanden hatten. Die Werte sind ähnlich den in Abb. 2 eingetragenen für die farblosen Euglenen mit Augenfleck. Hatten die Euglenen aber vorher Licht bekommen (650–800 Lux, mindestens 2 Std lang), so ergab sich ein ganz anderes Aktionsspektrum der negativen Phototaxis. Die maximale Wirksamkeit zeigte sich bei $467\text{ m}\mu$, ein Nebengipfel bei $425\text{ m}\mu$ (Abb. 2).

Eine Deutung würde voreilig sein, jedoch darf man wohl sagen, daß sich das Aktionsspektrum für die negative Phototaxis der grünen Form je nach der Vorbehandlung entweder dem der negativen Phototaxis farbloser Formen (mit oder ohne Augenfleck) oder dem der positiven Phototaxis grüner Formen nähert.

Im übrigen sei auf die ausführliche Diskussion bei HAUPT (1958) verwiesen.

Zusammenfassung

Das Aktionsspektrum für die negative Phototaxis von *Euglena gracilis* ist unterschiedlich, je nachdem, ob die Zellen an Dunkelheit oder an Licht adaptiert waren.

Dunkeladaptierte Zellen zeigen ein Maximum bei $410\text{ m}\mu$; lichtadaptierte haben ein Maximum bei $467\text{ m}\mu$, einen schwächeren Nebengipfel bei $425\text{ m}\mu$.

Literatur

- BÜNNING, E., u. G. SCHNEIDERHÖHN: Arch. Mikrobiol. **24**, 80 (1956). — BÜNNING, E., u. M. TAZAWA: Arch. Mikrobiol. **27**, 306 (1957). — GÖSSEL, I.: Arch. Mikrobiol. **27**, 288 (1957). — HALLDAL, P.: Physiologia Plant. **11**, 118 (1958). — HAUPT, W.: Handbuch der Pflanzenphysiologie **17/2**, 318 (1958).

(Aus der Staatlichen Anstalt für experimentelle Therapie „Paul-Ehrlich-Institut“
und dem Chemotherapeutischen Forschungsinstitut „Georg-Speyer-Haus“,
Frankfurt a. M.)

Properdin-System und Antikörperbildung

II. Der Serum-Properdinspiegel von Kaninchen während der Immunisierung mit *Salmonella typhosa* *

Von

H. WAHLIG

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 16. Oktober 1958)

In der 1. Mitteilung (WAHLIG 1959) wurde über Versuche berichtet, bei denen die Veränderungen des Serumproperdin-Spiegels von Kaninchen im Verlaufe von Immunisierungen mit *Mycobacterium tuberculosis* verfolgt und gleichzeitig spezifische Antikörperbestimmungen und papierelektrophoretische Analysen der Immenserum durchgeföhrt wurden. Bei diesen Untersuchungen handelte es sich um einen ersten Beitrag zur Klärung des Problems einer etwaigen Korrelation des Properdin-Spiegels mit der Antikörperbildung, wobei neben der Frage, ob Änderungen im Properdingehalt des Serums immunisierter Tiere mit der Antikörperbildung in Zusammenhang gebracht werden können, auch der Einfluß des Immunisierungsmodus auf die Properdinbewegungen geprüft werden sollte. Zu diesem Zweck wurde der Properdin-Spiegel der Versuchstiere während der Immunisierung mit Tuberkelbakterien und über einen längeren Zeitraum danach beobachtet.

Die gleiche Fragestellung und methodische Ausführung liegt den im vorliegenden Bericht beschriebenen Untersuchungen zugrunde; jedoch wurde für die Immunisierungsversuche ein Keim der Salmonellagruppe (*Salm. typhosa* Vi 41) verwendet, dessen Fähigkeit, bei Kaninchen Antikörper zu induzieren, bekannt war.

Material und Methoden

1. Tiermaterial: 2—3 kg schwere Kaninchen, die in zwei, bezüglich Fütterung und Haltung völlig gleichen Bedingungen unterworfenen Serien (zu je 11 Tieren) gesetzt wurden.

2. Als Antigen dienten mit Formol abgetötete Typhusbakterien (*Salm. typhosa* Vi 41) aus Rinderbouillonkultur, die zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in diesem Medium in der Dichte der Originalkultur suspendiert waren.

* Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeföhrt.

3. Immunisierungsmodus: Jedes Tier erhielt in zweitägigen Abständen insgesamt 6 intravenöse Injektionen zu je 1 ml (= 6 ml). In jeder Serie wurden jeweils 8 Tiere immunisiert; 3 Tiere blieben unbehandelt als Kontrollen.

4. Blutentnahmen: Zur Kontrolle der Antikörperbildung bzw. der Bewegungen des Serum-Propserdin-Spiegels während des Immunisierungsprozesses wurden Blutproben anfangs (5 Tage lang) täglich, später in größer werdenden Abständen aus der Ohrvene entnommen.

5. Properdin-Nachweis: Die Bestimmung des Properdin-Gehaltes der Testsera wurde nach der von McNALL (1957) angegebenen, in einigen Punkten modifizierten Technik des Properdin-Nachweises in biologischen Flüssigkeiten ausgeführt, deren methodische Einzelheiten in der 1. Mitteilung aufgeführt sind.

6. Antikörpertiter: Die Bestimmung der gegen die Typhusbakterien gebildeten Antikörper erfolgte durch Objektträger-Agglutination der homologen Keime durch die in geometrischer Reihe (Faktor 2) verdünnten Immunsera. Für die Bewertung der Agglutination wurde folgendes Schema zugrunde gelegt:

Agglutination sofort beim Einreiben:	++++
Agglutination nach 1 maligem Umschwenken:	+++
Agglutination nach 10 maligem Umschwenken:	++
Agglutination noch innerhalb von 2 min:	+

Die Berechnung der geometrischen Mitteltiter aus den mit ++++ bis 0 bewerteten Stufen der Serumverdünnungsreihen wurde mittels der von SPEARMAN 1908 (später von WIRTH 1912, 1940 bzw. KÄRBER 1931) angegebenen Methode unter Verwendung der Logarithmen (GADDUM 1933, v. D. WAERDEN 1940, SPAUN 1956) durchgeführt¹.

Versuchsergebnisse

A. Properdin-Spiegel während des Immunisierungsprozesses

Die graphische Darstellung der Mittelwerte der aus dem Serum antikörperbildender Kaninchen errechneten Properdineinheiten (PE) in Abhängigkeit von der Dauer des Versuches (Abb. 1, 2) läßt erkennen, daß nach einem geringfügigen Properdianstieg sofort nach begonnener Antigenapplikation die Properdinwerte am dritten Tage nach Immunisierungsbeginn ein Minimum erreichen und dann bis zu einem Maximum zwischen dem neunten und elften Tag stark ansteigen. Der Properdin-Spiegel geht anschließend langsam wieder zurück und nähert sich den Ausgangswerten.

Da aus technischen Gründen jede Serie nur aus 11 Tieren bestehen konnte (8 Tiere zur Immunisierung und 3 unbehandelte Tiere als Kontrollen), wurden die sich entsprechenden Properdin-Werte aus beiden Serien jeweils gemittelt. Dabei ist darauf hinzuweisen, daß die beiden Versuchsserien zwar nicht zeitlich, aber methodisch völlig analog durchgeführt wurden. Da für die Properdin-Bestimmung einer Serie die gleiche, für jede Serie aber eine andere Charge RP- und R3-Sera

¹ Dabei wird unterstellt, daß ++ dem 50%- (Mittel-)wert entspricht, was für die visuelle Beurteilung diffusen Bakterienwachstums (HELMERT, AUHAGEN u. IHM 1956) und von Hämolysehemmungs-Prozenten (HEYMANN, IHM u. TEN DOORN-KAAT 1957) nicht zutrifft und für das vorliegende System noch ungeklärt ist.

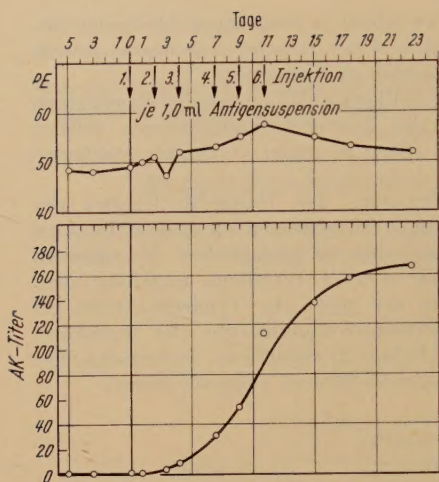


Abb. 1. Properdin-Spiegel (PE) und Antikörpertiter während des Immunisierungsprozesses. Serie 1

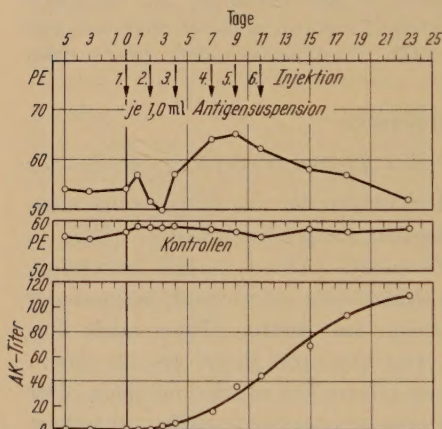


Abb. 2. Properdin-Spiegel (PE) der immunisierten Tiere sowie der Kontrolltiere und Antikörpertiter während des Immunisierungsprozesses. Serie 2

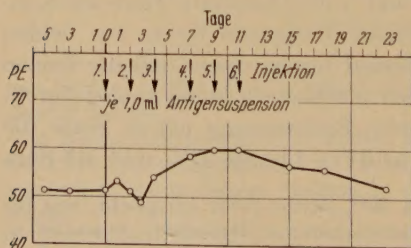


Abb. 3. Properdin-Mittelwerte (PE) aus Serie 1 und 2 während des Immunisierungsprozesses

verwendet wurde, lassen sich die absoluten PE-Werte nicht direkt miteinander vergleichen. So kann auch die Kurve der Mittelwerte aus Serie 1 und 2 (Abb. 3) nur in ihrem Verlauf einem Vergleich dienen, nicht aber bezüglich der absoluten Werte. Diese Darstellung der Mittelwerte von 16 Tieren zeigt jedoch deutlich den (wenn auch geringen) Anstieg und Abfall der Properdin-Werte zu Beginn der Immunisierung, das Maximum am Ende der Antigenverabreichung und den allmählichen Rückgang des Properdin-Spiegels zum Ausgangswert. In Abb. 2 sind die Properdin-Mittelwerte der drei unbehandelten Kontrolltiere von Serie 2 dargestellt. Die Kurve läßt erkennen, daß trotz der geringen Tierzahl die Schwankungen des Serum-Properdin-gehaltes während der Versuchsdauer gering sind. Die Kontrollen zu Serie 1 zeigen die gleichen geringen Schwankungen.

B. Antikörperbildung

Im Gegensatz zum Properdin-Spiegel, der zu Beginn der Antigengaben nur wenig ansteigt und nochmals abfällt, ehe er sich seinem Maximum nähert, setzt bei der Antikörperbildung am zweiten Tage nach Immunisierungsbeginn in beiden Serien ein steiler Titeranstieg ein, der, wenn auch langsam schwächer werdend, bis zum Versuchsende anhält (vgl. Abb. 1, 2).

Beurteilung der Ergebnisse

Im Verlaufe des beschriebenen Immunisierungsprozesses kommt es zu zwei deutlichen Erhöhungen der Serumproperdinwerte, die ein Properdinminimum einschließen. Dabei ist der erste Properdianstieg unmittelbar nach Immunisierungsbeginn gering, während das zweite Maximum des Properdin-Spiegels in beiden Serien auf rund 120% des Ausgangswertes ansteigt.

Die beiden Properdinkurven (vgl. Abb. 1 u. 2) verlaufen weitgehend gleichartig. Eine geringe zeitliche Verschiebung tritt nur bei den Maxima auf: bei Serie 1 ist das erste Maximum um einen Tag und das zweite Maximum um zwei Tage gegenüber Serie 2 verschoben.

Auch die Kurven für den Antikörpertiter laufen völlig konform, wenn auch bei Serie 2 der Titer hinter dem von Serie 1 zurückbleibt. Eine mit Hilfe der angewendeten Methode erfaßbare Antikörperbildung setzt bereits zur Zeit des Properdin-Minimums ein; der stärkste Anstieg des Antikörpertiters fällt etwa mit dem Properdin-Maximum zusammen, jedoch hält die Antikörperbildung noch an, wenn das Properdin bereits wieder abgesunken ist.

Diese Befunde zeigen im Vergleich mit den Ergebnissen der völlig analog durchgeführten Immunisierungsversuche mit Tuberkelbakterien (siehe WAHLIG 1959) gewisse Unterschiede, die unter Umständen mit der verschiedenartigen Natur der verwendeten Antigene in Zusammenhang gebracht werden können. Vor allem in dem deutlich ausgeprägten Minimum am Anfang des Immunisierungsprozesses und dem späten Auftreten des Maximums gegen Ende der Immunisierung liegt der Unterschied zwischen den mit *Salm. typhosa* und den früher mit *Tuberkelbakterien* durchgeführten Versuchen. Trotzdem ist die Kurve der zweiten Tuberkelbakterien-Serie (siehe WAHLIG 1959, Abb. 2) in ihrem Verlauf den „Typhuskurven“ sehr ähnlich.

Bei den beiden Typhusserien scheint auf Grund des antigenen Reizes sofort eine Properdinausschüttung zu erfolgen, wobei vielleicht gewisse Reserven mobilisiert werden. Die weitere Überschwemmung des Organismus mit Antigen führt dazu, daß das Properdin weitgehend an die Keime adsorbiert wird und ein gewisses Properdin-Defizit entsteht. Diese Adsorption ist bei gramnegativen Enterobakterien bekannt; sie konnte durch die kürzlich wiedergegebenen Versuche auch für Tuberkelbakterien nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Adsorption an Typhusbakterien jedoch stärker als an Tuberkelbakterien, so daß die Properdinreserven schlagartig erschöpft werden.

Erst nach einer gewissen Anlaufzeit setzt unter der fortdauernden Antigenezufuhr eine erhöhte Properdin-Produktion ein, die zu dem deutlichen zweiten Maximum führt. Gleichzeitig mit der Properdin-

zunahme steigt auch der Antikörperspiegel stark an. Dieser hat am Ende des Versuchs etwa seinen Höchstwert erreicht, während der Properdintiter wieder abgesunken ist.

Das vorliegende Ergebnis der Untersuchungen ist also ein erneuter Beweis für die bereits in der ersten Abhandlung geäußerte Auffassung, daß der Properdin-Titer einerseits und die Antikörperbildung bzw. die sich ausbildende Immunität andererseits nicht in unmittelbarer Beziehung zueinander stehen.

Die in der Literatur beschriebenen bakteriellen Einflüsse auf das Properdin-System wurden bereits in der 1. Mitteilung (WAHLIG 1959) ausführlich diskutiert, so daß sich eine weitere Erörterung in diesem Zusammenhang erübrigt.

Auf eine Tatsache soll zum Schluß noch aufmerksam gemacht werden: Die angewandte Methode des Properdinnachweises erlaubt in der bei den vorliegenden Versuchen durchgeführten Form eine sehr gute Reproduzierbarkeit von Properdinbestimmungen. Die methodisch bedingten Schwankungen konnten so niedrig gehalten werden, daß trotz Überlagerung durch die individuellen Schwankungen der Tiere sehr gute Kontrollwerte erhalten wurden, was für die Bewertung dieser von zahlreichen endogenen und exogenen Faktoren beeinflussten Untersuchungen von großer Wichtigkeit ist. Auf Grund der guten Übereinstimmung der Einzelwerte in beiden Serien, die sich nicht nur bei den Properdinwerten, sondern auch in dem völlig analogen Verlauf der Antikörpertiter zeigt, war es möglich, die Properdinwerte aller Versuchstiere bei der Auswertung zusammenzufassen. Die hieraus resultierende graphische Darstellung (Abb. 3) läßt die charakteristischen Bewegungen des Serumproperdinspiegels während des Immunisierungsprozesses noch deutlicher werden.

Zusammenfassung

Im Verlaufe von Immunisierungsversuchen mit *Salmonella typhosa* (Stamm Vi 41) wurden die Zusammenhänge zwischen Properdin-System und Antikörperbildung an Kaninchen untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen die bereits bei Untersuchungen mit Tuberkelbakterien erhobenen Befunde und lassen erkennen, daß der Properdintiter und die Antikörperbildung nicht in unmittelbarer Beziehung zueinander stehen.

Während des Immunisierungsprozesses treten zwei deutliche Erhöhungen der Serum-Propertdinwerte auf, die ein Properdin-Minimum einschließen. Die Kurve fällt jedoch nach relativ kurzer Zeit auf die Ausgangswerte zurück.

Die Antikörperbildung setzt sofort nach Immunisierungsbeginn ein und weist einen steilen Titeranstieg auf.

Die zur Durchführung des Properdin-Nachweises angewendete Methode ermöglicht eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Properdinbestimmungen.

Literatur

- GADDUM, J. H.: Med. Res. Council. Spec. Rep. Ser. **183**, 5 (1933). — HELMERT, E., H. AUHAGEN u. P. IHM: Arb. Paul-Ehrlich-Inst. **52**, 153 (1956). — HEYMANN, G., P. IHM u. G. TEN DOORNKAAT: Z. Immun.-Forsch. **114**, 85 (1957). — KÄRBER, G.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **162**, 480 (1931). — McNALL, E. G.: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **94**, 399 (1957). — SPAUN, J.: Acta path. microbiol. scand. **39**, 469 (1956). — SPEARMAN, C.: Brit. J. med. Psychol. **2**, 227 (1908). — v. D. WAERDEN, B. L.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **195**, 389 (1940). — WAHLIG, H.: Arch. Mikrobiol. **32**, 127 (1959). — WIRTH, W.: Psychophysik. Leipzig **1912**. — Wundts psychologische Studien **6**, 141 (1940).

(Aus dem Laboratorium für Biologie im Bundesgesundheitsamt,
Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene)

Polyploidie und Knöllchenbildung bei Leguminosen *

Von

G. TROLLDENIER

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. Oktober 1958)

Die Chromosomenverhältnisse der Leguminosenknöllchen wurden 1938 zum ersten Male von WIPF u. COOPER an Rotklee, Wicke und Erbse untersucht.

Während die Wurzelspitzen diploid sind, finden sich in den Knöllchen diploide und tetraploide Kernteilungsfiguren. Der zentrale Teil des Knöllchens besteht aus tetraploiden Zellen und wird von diploiden Rindenzellen umgeben. Wenig später teilte WIPF (1939) ähnliche Ergebnisse von 31 Leguminosenarten der Gattungen *Lathyrus*, *Medicago*, *Melilotus*, *Pisum*, *Trifolium* und *Vicia* mit. Von einigen Arten wurden auch künstlich erzeugte polyploide Pflanzen untersucht. Bei diesen fand sich in den Knöllchenzellen ebenfalls die doppelte Chromosomenzahl gegenüber den Wurzelspitzen.

WIPF u. COOPER (1940) untersuchten Leguminosenwurzeln auf das Vorkommen tetraploider Zellen und versuchten zu klären, ob solche Zellen mit der Entstehung des Knöllchens verbunden sind. Sie beobachteten gelegentliche tetraploide Teilungsfiguren in ungeimpften Wurzeln von *Pisum sativum*, *Lathyrus latifolius*, *L. odoratus*, *Vicia villosa* und *Lespedeza tomentosa*. Die tetraploiden Zellen erschienen im Rindenparenchym in der Region, in der sich die Wurzelhaare bilden. Spontan auftretende Mitosen fanden sich gewöhnlich in Zellen, die der Endodermis benachbart waren oder gelegentlich in den äußeren Schichten des Parenchyms nahe der Bildungsstätte von Seitenwurzeln.

WIPF u. COOPER glaubten, daß solche „disomatischen“ Zellen als Ergebnis einer Fusion von zwei Zellkernen entstanden seien. Im Hinblick auf die Ergebnisse der Endomitoseforschung muß jedoch angenommen werden, daß die Chromosomenverdopplung durch Endomitose zustande gekommen ist (GEITLER 1953). In den letzten Jahren wurde das Vorkommen von Endomitose in mehreren Pflanzenfamilien, auch bei den Leguminosen, nachgewiesen (vgl. GEITLER 1953).

Bei den meisten Leguminosen geht die Knöllchenbildung von Zellen des Rindenparenchyms aus. Da in Wurzelquerschnitten in der Nähe der Stellen, wo Infektionsschläuche der Rhizobien eine Knöllchenstimulierung verursachen, immer ein oder

* Auszug aus der gleichlautenden Dissertation der Fakultät für Landbau der Technischen Universität Berlin.

mehrere Mitosen „disomatischer“ Zellen auftraten, glaubten WIPF u. COOPER die Polyploidie des Knöllcheninneren auf polyploide Zellen der Wurzelrinde zurückführen zu können. Sie beobachteten ferner viele Infektionsschläuche, die keine Knöllchenbildung bedingten, obwohl sie mehrere Rindenzellschichten durchquert hatten. In diesen Fällen fanden sich keine „disomatischen“ Zellen. Es wird jedoch nicht mitgeteilt, ob diploide Mitosen in der Nähe dieser blinden Infektionsfäden auftraten.

Daraus schlossen WIPF u. COOPER, eine Knöllchenbildung erfolge nur, wenn ein Infektionsschlauch auf eine Zelle einer höheren polyploiden Stufe trafe. Diese Folgerung ist jedoch nicht stichhaltig. Wie sie selber berichten und wie auch von anderer Seite (vgl. D'AMATO 1952) festgestellt wurde, können durch den Reiz, den das Durchbrechen einer Seitenwurzel hervorruft, in den umgebenden Zellschichten Mitosen ausgelöst werden. Diese sind gelegentlich polyploid. Ähnlich wie das Durchbrechen einer Seitenwurzel muß ein entstehendes Knöllchen auf das umgebende Gewebe wirken. Ob aber die Zellen, von denen aus die Knöllchenbildung erfolgt, auch einer höheren Polyploidiestufe angehören, kann daraus nicht geschlossen werden.

Ein anderer Umstand stützt aber die Annahme von WIPF u. COOPER: Verglichen mit der Zahl der infizierten Wurzelhaare, durch die in den meisten Fällen die Infektion der Wurzel erfolgt, ist die Zahl der an der Pflanze gebildeten Knöllchen sehr klein. THORNTON (1929) fand bei Luzerne an acht Tage alten Sämlingen in 2%, bei etwas älteren in 4% der Wurzelhaare Infektionsschläuche. In anderen Versuchen waren 1% der Wurzelhaare infiziert (THORNTON 1936). Nach unserer Auffassung könnte das Mißverhältnis zwischen erfolgten Infektionen und tatsächlich gebildeten Knöllchen mit der relativ geringen Zahl polyploider Zellen, die nur von einem kleinen Teil der Infektionsfäden getroffen werden, in Beziehung gebracht werden.

Weiterhin verfolgten wir in entsprechender Richtung liegende Gedankengänge, wie sie BONNIER (1954) angestellt hat. Gelänge es, experimentell die Zahl polyploider Zellen in der Wurzel zu erhöhen, so müßte auch die Knöllchenzahl steigen, falls das Vorhandensein einer oder mehrerer tetraploider Zellen, umgeben von diploiden, Voraussetzung und begrenzender Faktor der Knöllchenentstehung sein sollte.

Eine Erhöhung des Anteils polyploider Zellen in der Wurzel ist durch Colchicin möglich. Wie ÖSTERGREN (1944) ausführt, bewirken bestimmte Verdünnungen von Colchicin das Auftreten von normalen Mitosen und Colchicinmitosen, wodurch ein Mischgewebe entsteht.

Wir untersuchten deshalb, um die Annahme von WIPF u. COOPER zu prüfen, den Einfluß von Colchicin auf die Knöllchenbildung. Dabei wurde auch eine histologische und cytologische Durchmusterung der Wurzeln und Knöllchen vorgenommen.

Bereits BONNIER (1954) beschreibt die Wirkung von Colchicin auf die Knöllchenbildung von *Medicago sativa* und *Trifolium pratense*. An den steril in Schrägagarröhrchen kultivierten Sämlingen trat bei einer bestimmten Colchiceinkonzentration eine Vermehrung der Knöllchenbildung ein. Es fehlte jedoch eine histologische und cytologische Kontrolle. Die Ergebnisse weichen auch in mancher Hinsicht von den hier beschriebenen ab, so daß an anderer Stelle auf diese Versuche näher eingegangen werden soll.

Die höhere Polyploidiestufe des Knöllcheninneren gegenüber der Wurzelspitze könnte noch anderweitig als durch im Rindenparenchym vorhandene polyploide Zellen bedingt sein, wie folgende Überlegungen zeigen.

Seit langem ist bekannt, daß die Knöllchen eine hohe Wuchsstoffaktivität besitzen (THIMANN 1936, LINK u. EGGERS 1940) und daß Rhizobien bei Vorhandensein von Tryptophan im Nährmedium zur Bildung von β -Indolylessigsäure befähigt sind (LINK 1937, CHEN 1938, GEORGI u. BEGUIN 1939).

Durch BRADLEY u. CRANE (1955) wurde erneut die Frage aktuell, ob Wuchsstoffe Polyploidie verursachen, was im Hinblick auf den hohen Wuchsstoffgehalt der Knöllchen von Bedeutung sein könnte. Bis dahin schien die polyploidisierende Wirkung von Wuchsstoffen endgültig verneint werden zu müssen, nachdem die diesbezüglichen Versuche von LEVAN (1939), GREENLEAF (1937) und DERMEN (1941) anders gedeutet wurden. In einer Reihe von Arbeiten (ausführliche Diskussion bei D'AMATO 1952) wurde bewiesen, daß die Wuchsstoffbehandlung lediglich die karyologische Situation offenbart und nicht selber Polyploidie verursacht. BRADLEY u. CRANE teilten jedoch einen Fall mit, in dem durch Wuchsstoffbehandlung bei Aprikosenfrüchten Endomitose ausgelöst werden konnte (vgl. auch TSCHERMAK-WOESS 1956).

Wenn Wuchsstoffeinwirkung in bestimmter Konzentration zu Endomitose führen sollte, wie oben angenommen wird, wäre es denkbar, daß die Rhizobien durch die nachgewiesene Wuchsstoffbildung eine Endopolyploidie veranlassen, worauf dann die Bildung des Knöllchens beginnen könnte. Hierüber sollen Versuche Aufschluß geben, bei denen, ähnlich wie mit Colchicin, der Einfluß verschiedener Konzentrationen von β -Indolylessigsäure und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure auf das Konsortium untersucht werden soll.

Endlich wäre eine dritte Erklärung für die höhere Polyploidiestufe des Knöllcheninneren denkbar.

C'AVALLI-SFORZA, PETRELLA u. GERRA (1955) untersuchten die Wirkung von Kulturfiltraten von Erdorganismen aus den Klassen der *Schizomycetes*, *Phycomycetes*, *Ascomycetes* und der *Fungi imperfecti* auf den Mitoseverlauf in Zwiebelwurzeln. Nach verschiedenen Zeiten konnten polyploide Mitosen beobachtet werden. Von den Autoren wird darauf hingewiesen, daß die colchicinähnlich wirkenden Stoffwechselprodukte von Bodenorganismen möglicherweise die spontan auftretende Polyploidisierung in Pflanzenwurzeln verursachen könnte. Ob allerdings

im Erdboden die dazu notwendigen Konzentrationen dieser Stoffe erreicht werden, bleibt dahingestellt.

Es ist somit zu untersuchen, ob Rhizobien oder deren Stoffwechselprodukte eine colchicinähnliche Wirkung hervorrufen können. Wäre dieses der Fall, so könnte die Verdoppelung des Chromosomensatzes in den inneren Zellen des Knöllchens durch die Tätigkeit der Bakterien bewirkt werden.

Im folgenden sollen die erörterten Hypothesen geprüft werden, um zu entscheiden, welche unter ihnen zur Erklärung der Verdoppelung des Chromosomensatzes herangezogen werden kann: 1. Geht die Knöllchenbildung von vorhandenen Zellen mit einer höheren Polyploidiestufe aus? 2. Ist die Wuchsstoffbildung der Rhizobien für die Polyploidie des Knöllcheninneren verantwortlich? 3. Erzeugen die Knöllchenbakterien colchicinähnlich wirkende Stoffwechselprodukte, die die Polyploidie verursachen?

Material und Methoden

Die Versuche wurden mit diploidem Rotklee (*Trifolium pratense*), tetraploidem Rotklee — Weibulls *R 28* —, diploidem Schwedenklee (*T. hybridum*), tetraploidem Schwedenklee und diploider Serradella (*Ornithopus sativus*) durchgeführt. Für die Laborversuche erfolgte die Kultur der verwendeten Pflanzenarten in Glasröhrchen (Durchmesser 1,3 cm, Länge 15 cm), die zu $\frac{2}{3}$ ihrer Höhe, so weit wurde die Nährlösung eingefüllt, in geeignete Papphüllen eingesenkt wurden. Diese Anordnung schützte die Wurzeln weitgehend vor Licht. Die Samen wurden in Petrischalen auf Fließpapier zum Keimen gebracht und die Sämlinge nach zwei bis vier Tagen mit Garnschlingen in die Röhrchen gehängt. Die Öffnung wurde mit Aluminiumfolie verdeckt. Die Abnahme der Nährlösung durch Verdunstung betrug während der Versuchsdauer höchstens 15%. Die bei Zimmertemperatur kultivierten Pflanzen erhielten täglich 16 Std zusätzliche Beleuchtung mit 40 Watt/2000 lm HNI- und HNT-Leuchtstoffröhren (Osram). Je Quadratmeter kamen sechs Leuchtstoffröhren. Die Entfernung von den Pflanzen betrug etwa 30 cm. Da die Knöllchenbildung durch mineralischen Stickstoff unterdrückt wird, diente eine Stickstoffmangellösung nach CRONE-MERKENSCHLAGER (aus SCHROPP 1951), im folgenden als Standardnährlösung bezeichnet, als Nährmedium: K_2SO_4 0,5 g/l; $Ca_3(PO_4)_2$ 0,25 g/l; $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 0,5 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g/l; $Fe_3(PO_4)_2$ 0,5 g/l; sowie als Spurenelementzusatz auf 10 l 5 mg $Na_2B_4O_7$ und 30 mg $MnSO_4$. Für Reinkulturen von Knöllchenbakterien wurde ein Nährmedium, angeführt bei FRED, BALDWIN u. McCoy (1932), verwendet: Mannit 10,0 g; K_2HPO_4 0,5 g; $MgSO_4$ 0,4 g; NaCl 0,1 g; $CaCO_3$ 3,0 g; Hefewasser (pH 6,8) 50,0 ml; aufgefüllt auf 1000 ml mit Aqua dest. Die Colchicinversuche wurden mit Colchicinum puriss. cryst. (E. Merck, Darmstadt) ausgeführt. Für die Wuchsstoffversuche wurde β -Indolylessigsäure, rein (Merck) und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (Dr. Theodor Schuchardt, München) verwendet.

Die Chromosomenuntersuchung wurde in Quetschpräparaten nach Fixierung in Alkohol-Eisessig und Färbung mit Karminessigsäure vorgenommen. Außerdem fertigten wir nach Fixierung in Nawaschinschem Gemisch (24 Std) und Einbettung in Paraffin 20 μ dicke Schnitte von Wurzeln und Knöllchen an, die mit Eisen-hämatoxylin nach HEIDENHAIN gefärbt wurden.

Die statistische Sicherung der Versuchsergebnisse erfolgte mit Hilfe der Varianzanalyse. Die Tabellenwerte und Formeln wurden aus WEBER (1956) entnommen.

Ergebnisse

I. Versuche mit Colchicin

1. Diploider Rotklee

a) Wuchs bei verschiedenen Colchicinkonzentrationen

Drei Tage nach der Aussaat auf Fließpapier kamen Rotkleesämlinge, je 15 für jede Versuchsserie, in die Standardnährlösung mit einer bestimmten Colchicinkonzentration, die mit einer Rhizobien-Aufschwemmung beimpft wurde. Die geprüften Konzentrationen und den Verlauf der Knöllchenbildung gibt Abb. 1 wieder.

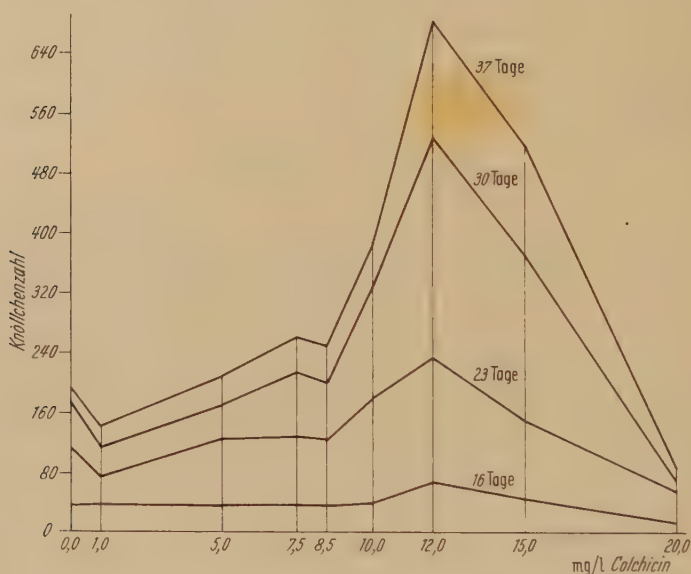


Abb. 1. Knöllchenbildung an diploidem Rotklee in Nährlösung bei verschiedenen Colchicinkonzentrationen (je 15 Pflanzen)

Habitus der Pflanzen bei Versuchsende: Die durch die Colchicineinwirkung bedingten Veränderungen der Knöllchen und übrigen Pflanzenteile sollen im folgenden näher beschrieben werden, da unsere Beobachtungen von denen BONNIERS (1954) abweichen und daher zu anderen Schlußfolgerungen führen.

Von 0,0–8,5 mg/l Colchicin hatten die Pflanzen in ihren oberirdischen Teilen das gleiche Aussehen. Außer zwei Pflanzen, die bei 8,5 mg/l viele kleine Knöllchen aufwiesen, fanden sich bezüglich der Bildung der Wurzeln und Knöllchen zwischen den Pflanzen keine Unterschiede.

Bei 10 mg/l blieb ein Teil der Pflanzen in seiner Laubentwicklung im Vergleich zu den vorher beschriebenen zurück. Gerade diese Pflanzen zeigten mehr, aber kleinere Knöllchen. Die stark schwankenden

Knöllchenzahlen dieser Versuchsreihe lassen darauf schließen, daß die Colchicinkonzentration in den einzelnen Röhrchen entweder verschieden schnell abnahm oder die Pflanzen bei bestimmten Konzentrationen individuell verschieden reagierten.

Eine deutlich schwächere Entwicklung zeigten die Pflanzen bei 12 mg/l Colchicin. Die Knöllchen blieben klein, entstanden aber bedeutend zahlreicher.

Bei 15 mg/l war der Wuchs stark gestaucht und die Wurzelausbildung gehemmt. Die kleinen Knöllchen, trotz ihrer großen Zahl, banden wahrscheinlich nur ungenügend Stickstoff. Möglicherweise wurde durch die gesteigerte Knöllchenbildung das Gleichgewicht der Symbiose zugunsten der Bakterien gestört.

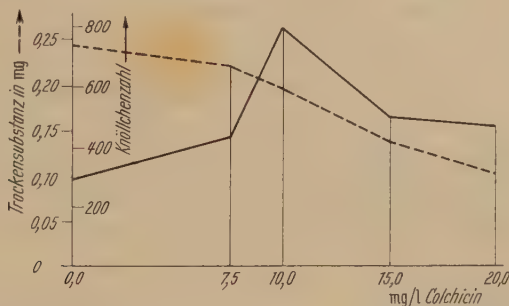


Abb. 2. Knöllchenzahlen und Trockensubstanzgehalt von diploidem Rotklee bei verschiedenen Colchicinkonzentrationen, 50 Tage nach der Aussaat (je 28 Pflanzen).
Knöllchenzahl ———; Trockensubstanz ———

Noch mehr im Wachstum gehemmt waren die Pflanzen bei 20 mg/l. Die Wurzeln waren zum größten Teil an der Spitze geschwollen und nicht weitergewachsen. Gebildete Seitenwurzeln blieben kurz und waren ebenfalls geschwollen. Wo die Wurzeln über die Schwellung hinauswuchsen, hatten sich an diesen perlschnurartig kleine Knöllchen gebildet. An den übrigen Pflanzen konnten sich nur wenige Knöllchen oberhalb der geschwollenen Wurzelspitzen bilden.

Nach Versuchsende in die Röhrchen gebrachte Sämlinge ließen nur bei 20 mg/l Anfangskonzentration C-Mitosen erkennen. Daraus ist zu ersehen, daß die Colchicinkonzentrationen im Verlauf des Versuches abnahmen, vermutlich teils durch Aufnahme der Pflanzen, teils durch mikrobielle Inaktivierung.

Wie der Versuch ergab, wird bei bestimmten Colchicinkonzentrationen zwar die Knöllchenzahl beträchtlich vermehrt, das Wachstum der Pflanzen aber nicht gefördert. Um diese Beobachtung mit Zahlenwerten zu belegen, wurden in einem weiteren Versuch Trockensubstanzbestimmungen vorgenommen. Jede Versuchsreihe umfaßte 28 Pflanzen. Es wurden folgende Colchicinkonzentrationen angewendet: 7,5, 10, 15 und

20 mg/l Colchicin. Abb. 2, in der Knöllchenzahlen und Trockensubstanzgehalt eingezeichnet sind, läßt erkennen, daß bis zu einer Konzentration von 10 mg/l die Knöllchenzahl steigt, während die Trockensubstanz abnimmt. Bei den höheren Colchicinkonzentrationen (15 und 20 mg/l) wird neben einer weiteren Verminderung der Trockensubstanz auch die Knöllchenbildung gehemmt. Bei 7,5 mg/l Colchicin lag eine Konzentration vor, die keine Beeinträchtigung der Wurzelbildung bewirkte. Zwar hatten sich kurz nach dem Einbringen in die Röhrchen C-Tumoren gebildet, die Wurzeln trieben aber weiter, so daß keine Hemmung der Wurzelbildung sichtbar war. Die gegenüber den Kontrollpflanzen gesteigerte Knöllchenzahl vermochte keine Wachstumsförderung zu bewirken. Die vermehrten, aber kleineren Knöllchen waren augenscheinlich weniger wirksam als die größeren, aber in geringerer Zahl vorhandenen Knöllchen der Kontrollpflanzen.

b) Histologische Befunde der mit Colchicin behandelten Wurzeln und Knöllchen

Es wurde histologisch der Einfluß des Colchicins auf Wurzeln und Knöllchen an Hand von 20 μ starken, mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN gefärbten Schnitten untersucht.

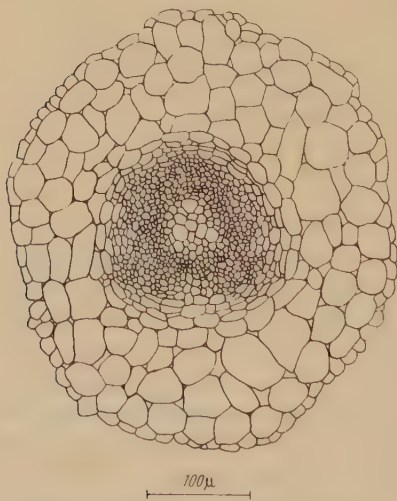


Abb. 3. Querschnitt durch eine unbehandelte Wurzel von *Trifolium pratense*

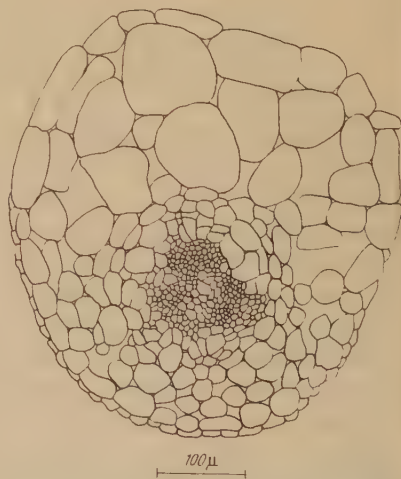


Abb. 4. Querschnitt durch eine mit 20 mg/l Colchicin behandelte Wurzel von *Trifolium pratense*

Der histologische Befund der Querschnitte der in colchicinhaltiger Nährlösung gewachsenen Wurzeln weicht stark von dem derjenigen aus colchicinfreier Nährlösung ab. Abb. 3 stellt einen Querschnitt durch eine normale ältere Wurzel dar. Die Zellen des Rindenparenchyms umgeben gleich-

mäßig den Zentralzylinder und sind von etwa gleicher Größe. Abb. 4 zeigt einen Querschnitt durch eine jüngere Wurzel aus colchicinehaltiger Nährlösung (20 mg/l). Die Zellen des Rindenparenchyms sind in der einen Hälfte um vieles größer als in der anderen. Es ist anzunehmen, daß diese polyploid sind. Einen Querschnitt durch eine ältere colchicinebeeinflusste Wurzel (15 mg/l) zeigt Abb. 5. Die Zellgrößen in der Rinde sind sehr unterschiedlich. Im Rindenparenchym ist Meristemtätigkeit zu beobachten. In den großen Zellen, die den Meristemzellen anliegen, sind Bakteroiden sichtbar. Offenbar liegt hier der

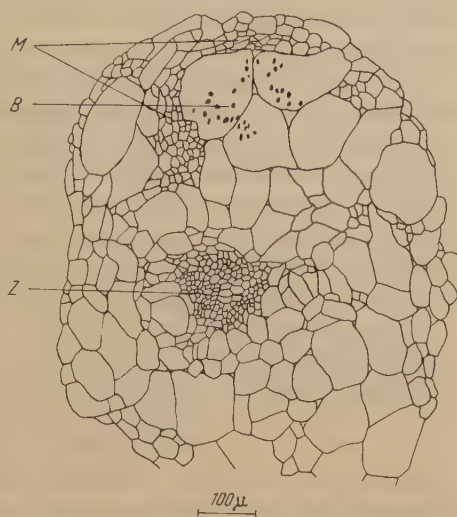


Abb. 5. Querschnitt durch eine mit 15 mg/l Colchicin behandelte Wurzel von *Trifolium pratense* mit Meristem (*M*) eines entstehenden Knöllchens. In den anschließenden großen Zellen befinden sich Bakteroiden (*B*). *Z* Zentralzylinder

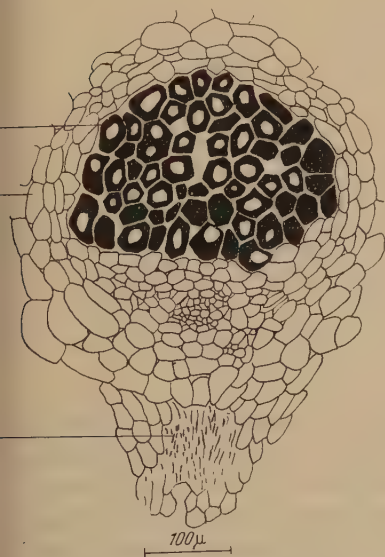


Abb. 6. Querschnitt durch ein normales Knöllchen einer unbehandelten Pflanze von *Trifolium pratense*. *B* mit Bakteroiden dicht gefüllte Zellen, *R* Rindenzellen des Knöllchens, *Z* Zentralzylinder der Wurzel — schräg geschnitten

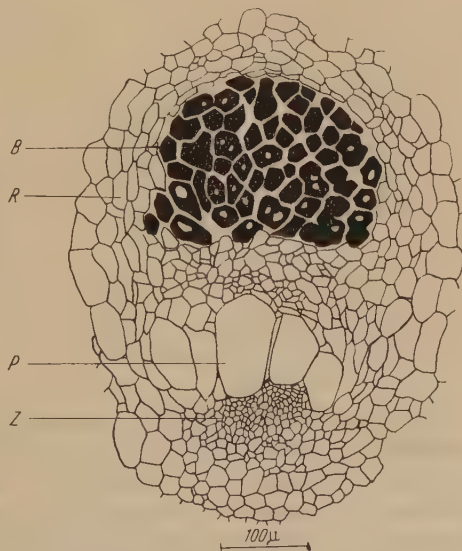


Abb. 7. Querschnitt durch ein Knöllchen einer mit 15 mg/l Colchicin behandelten Wurzel von *Trifolium pratense*. *B* mit Bakteroiden dicht gefüllte Zellen, *R* Rindenzellen des Knöllchens, *P* stark vergrößerte, augenscheinlich polyploide Zellen. *Z* Zentralzylinder

Beginn einer Knöllchenentstehung vor. Entlang der ganzen Wurzel sind diese rudimentären Knöllchen zu finden, die sich nicht weiter ausbilden und nur Erhebungen auf der Wurzeloberfläche sind. Ein Vergleich mit Abb. 3 läßt darauf schließen, daß das Rindenparenchym aus verschiedenen Polyploidiestufen besteht. Die in normalen Wurzeln nur geringe Zahl polyploider Zellen scheint hier beträchtlich erhöht. In Abb. 7 ist zu sehen, wie die Knöllchenbildung von polyploiden Zellen ausgeht. Der Querschnitt stammt von einer Pflanze, die in einer 15 mg/l Colchicin enthaltenden Nährlösung gewachsen war. Die großen, augenscheinlich polyploiden Zellen grenzen an den Zentralzylinder. An diese Zellen schließt das Knöllchen an. Die Zellen mit dunklem Inhalt sind dicht gefüllt mit Bakteroiden. Als Vergleich stellt Abb. 6 einen Querschnitt durch ein Knöllchen einer Kontrollpflanze dar.

2. Tetraploider Rotklee

Analog den Versuchen mit diploidem wurde auch bei tetraploidem Rotklee der Einfluß verschiedener Colchicinkonzentrationen auf die Knöllchenbildung untersucht. Zwei Tage nach dem Einhängen wurden die Wurzelspitzen einiger zur Kontrolle mit in die Röhren gebrachten

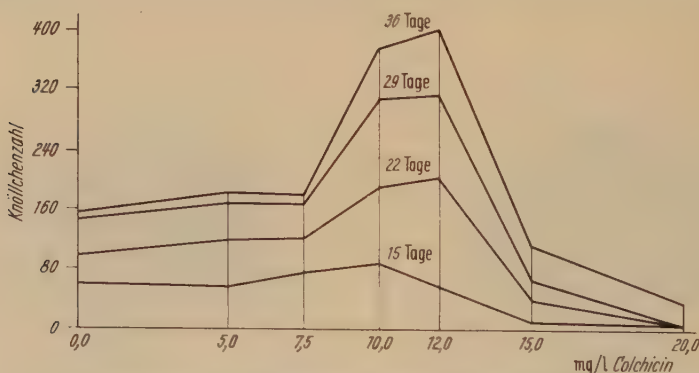


Abb. 8. Knöllchenbildung an tetraploidem Rotklee in Nährlösung bei verschiedenen Colchicinkonzentrationen (je 15 Pflanzen)

Sämlinge cytologisch durch Färbung mit Karminessigsäure in Quetschpräparaten untersucht. Von 10 mg/l Colchicin ab waren in den Wurzelspitzen verklumpte C-Mitosen zu sehen. Entweder waren alle Mitosen in der durchmusterten Wurzelspitze verklumpt, oder es waren neben diesen auch normale tetraploide Mitosen zu beobachten. Der Verlauf der Knöllchenbildung ist aus Abb. 8 zu ersehen.

Habitus der Pflanzen bei Versuchsende: Die Pflanzen der Versuchsreihen von 0,0–7,5 mg/l Colchicin ließen untereinander keine Unterschiede in ihrer Entwicklung, der Zahl und dem Aussehen ihrer

Knöllchen erkennen. Bei 10 und 12 mg/l hatten die meisten Pflanzen mittelgroße Knöllchen, die in großer Zahl entstanden. Bei 15 mg/l waren die Wurzeln zum Teil geschwollen und nicht weitergewachsen. Die Blattentwicklung blieb zurück, und die Pflanzen zeigten deutlich Nahrungsmangel infolge der schlechten oder völlig verhinderten Ausbildung der Wurzeln. Die Schwellung der Wurzeln bei 20 mg/l war noch stärker. Knöllchen konnten sich daher bei vielen Pflanzen nur oberhalb dieser bilden, wenn sie nicht überhaupt fehlten. An einer Pflanze hatte sich oberhalb der geschwollenen Wurzelspitze eine Seitenwurzel gebildet, an der Knöllchen perlschnurartig aneinandergereiht waren.

3. Diploider Schwedenklee

Es wurden die in Abb. 9 verzeichneten Konzentrationen angewendet. Der Ansatz der colchicinhaltigen Nährlösung erfolgte wie bei den vorhergehenden Versuchen. Die Röhrchen beimpften wir mit der auch in den früheren Versuchen verwendeten *Rhizobium trifolii*-Aufschwemmung. Abb. 9 veranschaulicht das Versuchsergebnis.

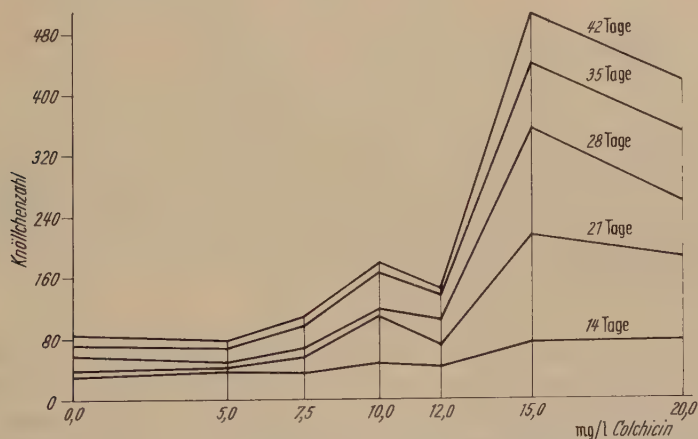


Abb. 9. Knöllchenbildung an diploidem Schwedenklee in Nährlösung bei verschiedenen Colchicinkonzentrationen (je 15 Pflanzen)

Habitus der Pflanzen bei Versuchsende: Die Pflanzen der Versuchsreihen von 0,0–7,5 mg/l Colchicin zeigten in ihrer Entwicklung keine Unterschiede. Bei 10 und 12 mg/l waren die Pflanzen mit der größten Knöllchenzahl im Wuchs gedrungener. Die Blätter waren klein und etwas heller. Deutlich schwächer entwickelt erschienen die Pflanzen der Versuchsreihe mit 15 mg/l, die die höchste Knöllchenzahl aufwies. Die Knöllchen blieben klein und bildeten sich an Haupt- und Nebenwurzeln oft dicht hintereinander. Bei 20 mg/l war die Entwicklung der Pflanzen noch schwächer. Die Pflanzen fingen teilweise an abzusterben.

Die Primärwurzel war bei vielen an der Spitze geschwollen. Darüber entstanden Seitenwurzeln, die perlschnurartig mit kleinen, oft nur angedeuteten Knöllchen besetzt waren und nicht alle erfaßt werden konnten.

4. Tetraploider Schwedenklee

Der Versuch mit tetraploidem Schwedenklee konnte wegen der geringen Menge des zur Verfügung stehenden Saatgutes, ferner wegen der schlechten Keimkraft und Keimfähigkeit nur mit vier Versuchsgliedern durchgeführt werden. Das Ergebnis zeigt Abb. 10. Die geringen

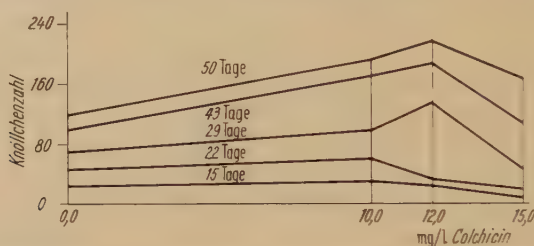


Abb. 10. Knöllchenbildung an tetraploidem Schwedenklee in Nährlösung bei verschiedenen Colchicinkonzentrationen (je 15 Pflanzen)

Unterschiede der Knöllchenzahlen haben ihre Ursache wahrscheinlich in der schlechten Anfangsentwicklung der Pflanzen. Die Unterschiede konnten mit Hilfe der Varianzanalyse nicht gesichert werden. Immerhin zeigt der Vergleich der Knöllchenzahlen, daß an einzelnen Pflanzen der colchicinbehandelten Versuchsreihen Knöllchenzahlen auftraten, die bei den Kontrollpflanzen nicht gefunden wurden.

5. Diploide Serradella

Wie Testversuche ergaben, wirkt Colchicin bei Serradella erst in höheren Konzentrationen als bei den verwendeten Kleearten auf die Mitose ein. Es wurden daher die in Abb. 11 aufgeführten Konzentrationen gewählt. Die Impfung der Nährlösung erfolgte mit einer Rhizobien-Aufschwemmung aus zerquetschten Knöllchen von diploider Serradella. Vier Tage nach der Aussaat wurden die Keimlinge in die Röhrchen gehängt. Nach weiteren zwei Tagen wurden Wurzelspitzen zusätzlich in die Röhrchen gebrachter Sämlinge auf das Vorkommen von C-Mitosen untersucht. Nur bei 60 und 65 mg/l Colchicin waren in den Wurzelspitzen neben normalen auch verklumpte Mitosen zu bemerken. Die Knöllchenzunahme zeigt Abb. 11.

Habitus der Pflanzen bei Versuchsende: Bis zu 30 mg/l waren hinsichtlich der Laubentwicklung keine Unterschiede festzustellen. Auch bei 40 mg/l ähnelten die meisten Pflanzen den Kontroll-exemplaren. Bei 42,5 mg/l war die Laubentwicklung um ein geringes schwächer. Während

die vorhergehenden Versuchsreihen große Knöllchen hatten, waren bei diesen mehr kleinere zu bemerken.

Von 40 mg/l ab hatte das Colchicin einen sichtbaren Einfluß auf das Wurzelwachstum. Die Hälfte der Pflanzen zeigte bei dieser Konzentrationsstufe C-Tumoren. Bei der ersten Zählung nach 14 Tagen wurden noch keine Schwellungen bemerkt. Sie traten erst nach insgesamt 21 Tagen auf und unterschieden sich deutlich von denen der für die Versuche verwendeten Kleearten. Bei jenen waren sie schon nach zwei Tagen deutlich sichtbar. Bei der *Serradella* wuchsen die Wurzeln fast

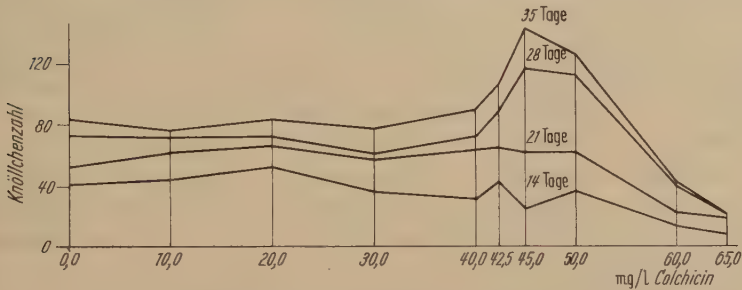


Abb. 11. Knöllchenbildung an diploider *Serradella* in Nährlösung bei verschiedenen Colchicinkonzentrationen (je 10 Pflanzen)

bis zum Boden der Röhrchen, ehe sich C-Tumoren bildeten. Der Habitus der C-Tumoren war auch von dem derjenigen bei *Trifolium* verschieden. Die Wurzeln verdickten sich allmählich bis nahe zur Wurzelspitze hin. Diese verdickten Wurzelteile erinnerten äußerlich an kohlherniebefallene junge Cruciferenpflanzen. Die Seitenwurzeln schwellen hingegen kurz nach dem Austrieb an. Bei einigen Pflanzen wechselten verdickte und normale Wurzelstrecken ab. Außer einigen normalen großen Knöllchen waren an den Pflanzen viele kleine zu bemerken. Die Pflanzen mit höherer Knöllchenzahl hatten hellere Blätter. Ihr Wuchs war gestauchter als der der übrigen.

Bei 50 mg/l waren die C-Tumoren stärker ausgebildet und die Wurzeln zum Teil nicht weitergewachsen. Auch hier fanden sich neben einigen normal großen viele kleine Knöllchen.

Von 60 mg/l ab konnte das Anschwellen der Wurzelspitze schon bei der ersten Auszählung festgestellt werden. Die Wurzeln blieben kurz und wuchsen nicht weiter. Auch das Hypokotyl in der Nähe der Keimblätter war bei einigen verdickt. Die Blätter bildeten sich dann nur kümmerlich aus. Die stärksten C-Tumoren der Wurzeln wurden in der 65 mg/l Anfangskonzentration enthaltenden Nährlösung gefunden. Bei vielen Pflanzen war das Hypokotyl geschwollen und die Blattentwicklung sehr verkümmert.

II. Einfluß von Rhizobien und deren Stoffwechselprodukten auf die Zellteilung

Um zu erfahren, ob Knöllchenbakterien oder ihre Stoffwechselprodukte C-mitotische Wirkungen auslösen, wurde folgender Versuch unternommen:

Röhrchen wurden mit 15 ml des flüssigen Nährmediums für Rhizobien nach FRED, BALDWIN u. MCCOY (1932) gefüllt. Nach zweimaligem Sterilisieren im Dampftopf, je 30 min an zwei aufeinanderfolgenden Tagen, wurden die Röhrchen mit einer Reinkultur von *Rhizobium trifolii* angeimpft. Die Sterilisation der Samenoberfläche des verwendeten diploiden Rotklees wurde folgendermaßen durchgeführt: Nach 15 sec langem Eintauchen in 96%igem Alkohol kamen die Samen 6 min in 0,2%iges Sublimat und wurden anschließend 8mal in sterilem Wasser gewaschen (nach BONNIER, variiert). Die Aussaat erfolgte in Petrischalen, die vorher samt Fließpapier trocken sterilisiert waren (2 Std bei 160° C). Die 2 Tage alten Sämlinge wurden an sterilen Garnschlingen in die Röhrchen eingehängt. Zur Kontrolle wurden Sämlinge auch in das sterile, ungeimpfte Nährmedium gebracht.

Das Wurzelwachstum war in der sterilen Nährlösung besser als in den Rhizobienkulturen. Die laufende cytologische Untersuchung erfolgte täglich, vom zweiten bis zum fünften Tage, an je 5 mit Karminessigsäure gefärbten Wurzelspitzen in Quetschpräparaten. Von den Kontrollpflanzen wurden am zweiten und fünften Tage je 5 Wurzelspitzen untersucht. Da mit dieser Methode die Kernspindel nicht gefärbt wird, wurden die Mitosen lediglich auf die Chromosomenzahl und das Auftreten verklumpter Mitosen hin untersucht. In allen Wurzelspitzen fanden sich nur normale diploide Mitosen. Eine Chromosomenverdoppelung durch Rhizobienstoffwechselprodukte konnte bei den untersuchten Pflanzen nicht festgestellt werden.

III. Einfluß verschiedener Wuchsstoffkonzentrationen auf die Knöllchenbildung von diploidem Rotklee

Als letztes blieb noch zu prüfen, ob Wuchsstoffe für die Polyploidie des Knöllcheninneren verantwortlich sind.

1. 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure

Junge Sämlinge wurden in die Standardnährlösung mit 2,4-D-Konzentrationen von 0,1 γ /l bis 10 mg/l gebracht. Bis zu 0,5 γ /l war die Wurzel Ausbildung normal, bei den darüberliegenden geprüften Konzentrationen erfolgte eine Beeinträchtigung des Wurzelwachstums. Bei keiner Versuchsreihe trat eine Steigerung der Knöllchenbildung ein, wie sie bei den Colchicinversuchen zu beobachten war.

2. β -Indolylessigsäure

Es wurden Konzentrationen von 0,1 γ /l bis 100 mg/l geprüft. Auch hier trat keine vermehrte Knöllchenbildung ein.

Diskussion

Der Vergleich der Ergebnisse von Sämlingen unter Einwirkung von Colchicin, von Rhizobienstoffwechselprodukten und von Wuchsstoffen läßt eine klare Entscheidung zu.

Rhizobienstoffwechselprodukte bewirken weder Colchicin- noch polyploide Mitosen. Somit ist es unwahrscheinlich, daß die Polyploidie des Knöllcheninneren durch die Wirkung infizierender Rhizobien ausgelöst wird.

Wie die Wuchsstoffversuche ergaben, ist die eingangs von uns in Betracht gezogene Möglichkeit der endomitotischen Polyploidisierung durch die im Schrifttum angegebene Wuchsstoffbildung der Rhizobien gegenstandslos geworden. Offensichtlich erfolgte durch die Wuchsstoffbehandlung keine Vermehrung der endomitotisch entstandenen polyploiden Zellen. Im umgekehrten Falle wären sicher bei der einen oder anderen Wuchsstoffkonzentration die Knöllchenzahlen, wie etwa bei der Colchicineinwirkung, erhöht worden. BRADLEY u. CRANE (1955) erwägen allerdings, daß gegebenenfalls Endomitoseauslösung nur in solchen Zellkernen erfolgt, in denen schon natürlicherweise eine Endomitose vorstatten gegangen ist. Das von ihnen untersuchte Mesokarp der Aprikosenfrüchte enthält auch in den unbehandelten Kontrollfrüchten keine $2n$ -Kerne. Durch die Wuchsstoffbehandlung vergrößerte sich jedoch der Anteil der höheren Polyploidiestufen. Die von BRADLEY u. CRANE gemachte Einschränkung könnte das Ergebnis der Wuchsstoffversuche erklären. In den Zellschichten, von denen die Knöllchenbildung ausgeht, scheint nur ein geringer Teil der Zellkerne Endomitose einzugehen. Wenn die der Nährlösung zugefügten Wuchsstoffe nur auf diese Zellkerne endopolyploidisierend wirken können, würde sich das natürliche Verhältnis, wie im Falle des diploiden Rotklee, von diploiden zu polyploiden Zellen nicht verändert haben. Die Knöllchenbildung hätte daher nicht gesteigert werden können.

Die Entstehung eines Knöllchens hängt, wie die Colchicinversuche bewiesen, von dem Vorhandensein polyploider Zellen ab. Damit konnte die Annahme von WIPF u. COOPER bestätigt werden. Es muß ein Gefälle von Zellen unterschiedlicher Polyploidiestufen bestehen. Normalerweise ist die Zahl der endomitotisch entstandenen polyploiden Zellen, wie Kontrolluntersuchungen bei diploidem Rotklee zeigten, sehr klein. Quetschpräparate von Wurzeln junger Sämlinge, die 4 Tage mit 20 mg/l 2,4-D behandelt und anschließend mit Karminessigsäure gefärbt wurden, ließen längs des am Zentralzylinder entstehenden Meristems nur sehr vereinzelt tetraploide Mitosen erkennen. Wenn auch mit der angewendeten Methode nicht alle polyploiden Mitosen erfaßt werden konnten, so war trotzdem zu erkennen, daß die Zahl dieser Zellen sehr niedrig sein muß. Durch bestimmte Colchicinkonzentrationen gelang es nun,

die Zahl polyploider Zellen zu erhöhen, also ein Mischgewebe von Zellen verschiedener Polyploidiestufen zu erzeugen. Die abgebildeten Wurzelquerschnitte zeigen Zellen sehr unterschiedlicher Größe im Rindenparenchym der colchicinbehandelten Pflanzen. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist anzunehmen, daß die Zellen mit dem stark vergrößerten Volumen polyploid sind. Der Bereich der Colchicinkonzentrationen, der eine nur teilweise Polyploidisierung bewirkt, ist sehr eng. Er liegt für Rotklee (diploid und tetraploid), Schwedenklee (diploid und tetraploid) und Gelbklee (diploid und tetraploid)¹ zwischen 7,5 und 12 mg/l. Bei *Serradella* treten bei diesen Konzentrationen noch keine Colchicinitosen auf, sie sind erst zwischen 42,5 und 50 mg/l zu finden. Zum Vergleich sei angeführt, daß bei *Allium cepa* nach 4 Std Behandlung die Schwelle bei 50–100 mg/l liegt (LEVAN 1938). NEBEL u. RUTTLE (nach LEVAN 1938) geben den Schwellenwert bei *Tradescantia* dicht über 40 mg/l an. Es bestehen also zwischen den verschiedenen Gattungen Unterschiede.

Mit steigender Colchicinkonzentration nimmt die Zahl polyploider Zellen zu. Entsprechend erhöht sich auch die Knöllchenzahl, wie aus unseren Versuchen hervorgeht. Es entstehen durch die Colchicinwirkung nicht allein tetraploide Restitutionskerne. Diese unterliegen in der nächsten Mitose wieder der Colchicinwirkung, so daß ein Gewebe unterschiedlicher Polyploidiestufen entsteht. Junge, in Colchicininlösung wachsende Sämlinge von diploidem Rotklee, die vier Tage mit 20 mg/l 2,4-D behandelt waren, ließen in den C-Tumoren neben diploiden auch tetraploide und oktaploide Metaphasen erkennen. Ein solches Mischgewebe bedingt die Entstehung einer oft nicht mehr zu zählenden Menge von Knöllchen, wie im Falle der beschriebenen perlschnurartigen Knöllchenbildung. Der unmittelbare Zusammenhang zwischen polyploiden Zellen der Wurzelrinde und der Knöllchenentstehung ist an einem Wurzelquerschnitt in Abb. 7 zu erkennen, der einer Pflanze entstammt, an der zwar nicht perlschnurartige Knöllchenbildung erfolgte, aber die Zahl der Knöllchen deutlich erhöht war.

Mit steigender Knöllchenzahl geht, wie aus den Versuchsberichten und den Trockensubstanzbestimmungen zu erschen ist, eine Wachstums- hemmung der Pflanze einher. Außer acht gelassen wurden die Colchicinkonzentrationen, die eine Entwicklung des Wurzelsystems verhinderten.

Die Beobachtung steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von BONNIER (1954) mit *Medicago sativa* und *Trifolium pratense*. Der Autor ließ, abweichend von unserer Methode, die Sämlinge steril in Schrägagarröhrchen wachsen. Die Colchicinzugabe erfolgte teilweise, nachdem das Agar erstarrt war. Durch die Arbeitsweise von BONNIER wurde das

¹ In dieser Arbeit nicht näher ausgeführt.

Colchicin offenbar ungleichmäßig verteilt und dadurch partiell so hohe Konzentrationen erreicht, daß C-Mitosen ausgelöst werden konnten. BONNIER berichtet auch, im unteren Abschnitt der Hauptwurzeln seien die Knöllchen dermaßen zahlreich aufgetreten, daß es schwer war, sie zu zählen. Bei der höheren Colchicingabe, die bei vollständiger Vermischung des Colchicins mit dem Substrat einer Endkonzentration von 40 mg/l entsprochen hätte, trat eine Wachstumshemmung wie auch eine Hemmung der Knöllchenbildung ein. Die wenigen Knöllchen waren bei diesen Pflanzen größer als bei den Kontrollpflanzen. Diese Beobachtung entspricht nicht der von uns gemachten. Nirgends waren an Pflanzen, deren Wurzeln bei den höheren Konzentrationen geschwollen waren, größere Knöllchen zu finden. Auch die perlschnurartig dicht gedrängten, oft kaum sichtbaren Knöllchen beschreibt BONNIER nicht. Während in unseren Versuchen bei den colchicinbehandelten Pflanzen deren Wurzel Ausbildung nicht gehemmt war, die Laubentwicklung gegenüber den Kontrollpflanzen zurückblieb und auf Stickstoffmangel deutete, beschreibt BONNIER eine üppigere Entwicklung der Blätter bei den Pflanzen, die in den Röhren mit der niedrigeren Colchicingabe wuchsen. Analog verlief sein Versuch mit Luzerne, die nach seinen Angaben jedoch eine größere Empfindlichkeit gegenüber dem Colchicin aufwies. Möglicherweise könnte ein Teil der abweichenden Befunde auf die unterschiedliche Arbeitsmethode von BONNIER zurückzuführen sein.

An Hand seiner Ergebnisse erörtert BONNIER die Möglichkeit der Colchicinanwendung für ackerbauliche Zwecke, weist aber auf die besondere Schwierigkeit der richtigen Dosierung hin. In unseren Versuchen brachte die Erhöhung der Knöllchenzahl keine Förderung des Wachstums der Pflanzen. Eine Colchicinanwendung beim Leguminosenanbau scheint daher keine Berechtigung zu haben, wenn auch endgültig darüber erst nach entsprechenden Freilandversuchen geurteilt werden kann.

Die Notwendigkeit des Vorkommens von Endomitose für die Knöllchenbildung könnte gegebenenfalls das Fehlen der Knöllchenentstehung bei einigen Leguminosen erklären. Nach dieser Hypothese müßte bei verschiedenen Leguminosengattungen im Wurzelparenchym Endomitose unterbleiben. Die in einer Zusammenstellung von O. N. u. E. K. ALLEN (1947) angeführten nichtknöllchenbildenden Leguminosen sind unseres Wissens auf das Vorkommen von Endomitose bisher nicht untersucht worden. Nach TSCHERMAK-WOESS (1956) kann gegenwärtig die Frage, ob es bei den Angiospermen Arten gibt, bei denen Endomitose überhaupt nicht vorkommt, noch nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Immerhin besteht die Möglichkeit, daß die Knöllchenbildung auch aus anderen Gründen fehlen kann (vgl. FRED, BALDWIN u. MCCOY 1932, ALLEN u. BALDWIN 1954, sowie THORNTON 1954).

Zusammenfassung

1. Die untersuchten Knöllchenbakterien bilden an den verwendeten Pflanzen keine polyploidisierend wirkenden Stoffwechselprodukte, wie sie von anderen Mikroorganismen bekannt sind.

2. Die Wuchsstoffbildung der Rhizobien scheint mit der Polyploidie des Knöllcheninneren nicht zusammen zu hängen.

3. Eine Voraussetzung der Knöllchenentstehung ist vielmehr das Bestehen eines Gefälles unterschiedlicher Polyploidiestufen in der Wurzelrinde, wie aus den Colchicinversuchen hervorgeht. Durch Vermehrung der polyploiden Zellen bei bestimmten Colchicinkonzentrationen kann bei diploiden Leguminosen eine Erhöhung der Knöllchenzahlen erreicht werden, ein Kennzeichen dafür, daß die normalerweise geringe Zahl solcher Zellen ein begrenzender Faktor für die Knöllchenentstehung ist. Analoges gilt für tetraploide Leguminosen.

Für die Überlassung des Themas der Arbeit und wertvolle Anregungen bin ich Herrn Prof. Dr. BRINGMANN zu großem Dank verpflichtet.

Ferner möchte ich der Firma Weibull, Landskrona/Schweden, für den tetraploiden Rotklee und Herrn Dr. HERTZSCH, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln-Vogelsang, für den tetraploiden Schwedenklee herzlich danken.

Literatur

ALLEN, O. N., and E. K. ALLEN: A survey of nodulation among leguminous plants. *Proc. Soil Sci. Soc. Amer.* **12**, 203 (1947). — ALLEN, O. N., and J. L. BALDWIN: Rhizobia-Legume relationships. *Soil Sci.* **78**, 415 (1954).

BONNIER, C.: Action de la colchicine sur la symbiose *Rhizobium-Medicago sativa* et *Rhizobium-Trifolium pratense*. *Bulletin de l'Institut Agronomique et des Stations de Recherches de Gembloux* **22**, 167 (1954). — BRADLEY, M. V., and J. C. CRANE: The effect of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid on cell and endopolyploidy in parenchyma of apricot fruits. *Amer. J. Bot.* **42**, 273 (1955).

CAVALLI-SFORZA, L. L., L. PETRELLA and A. GERRA: Cytologically active substances produced by soil microorganisms. *Heredity* **9**, 249 (1955). — CHEN, H. K.: Production of growth-substance by clover nodule bacteria. *Nature (Lond.)* **142**, 753 (1938).

D'AMATO, F.: New evidence on endopolyploidy in differentiated plant tissues. *Caryologia* **4**, 121 (1952). — DERMEN, H.: Intranuclear polyploidy in bean induced by naphthalene-acetic acid. *J. Hered.* **32**, 133 (1941).

FRED, E. B., I. L. BALDWIN and E. MCCOY: Root nodule bacteria and Leguminous plants. *Univ. of Wisconsin Studies in Sci.* Number 5 (1932).

GEITLER, L.: Endomitose und endomitotische Polyploidisierung. *Protoplasmatologia, Handbuch der Protoplasmaforschung*, Bd. VI C. Wien: Springer-Verlag 1953. — GEORGI, C. E., and A. E. BEGUIN: Heteroauxin production by efficient and inefficient strains of rhizobia. *Nature (Lond.)* **143**, 25 (1939). — GREENLEAF, W. H.: Induction of polyploidy in *Nicotiana*. *Science* **86**, 565 (1937).

LEVAN, A.: The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas (Lund)* **24**, 471 (1938). — Cytological phenomena connected with the root swelling caused by growthsubstances. *Hereditas (Lund)* **25**, 87 (1939). — LINK, G. K. K.: Role of heteroauxones in legume nodule formation, beneficial host

effects of nodules, and soil fertility. *Nature* (Lond.) **140**, 507 (1937). — LINK, G. K. K., and V. EGGERS: *Avena* coleoptile assay of ether extracts of nodules and roots of bean, soybean and pea. *Bot. Gaz.* **101**, 650 (1940).

ÖSTERGREN, G.: Colchicine mitosis, chromosome construction, narcosis and protein chain folding. *Hereditas* (Lund) **30**, 429 (1944).

SCHROPP, W.: *Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik. Der Vegetationsversuch. Die Methodik der Wasserkultur höherer Pflanzen.* Radebeul und Berlin: Neumann-Verlag 1951.

THIMANN, K. V.: On the physiology of the formation of nodules on legume roots. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **22**, 511 (1936). — THORNTON, H. G.: The rôle of the young lucerne plant in determining the infection of the root by the nodule forming bacteria. *Proc. roy. Soc. B* **104**, 481 (1929). — The action of sodium nitrate upon the infection of lucerne root-hairs by nodule bacteria. *Proc. roy. Soc. B* **119**, 474 (1936). — The nodule bacteria and their host legumes: some problems that they still present. *Science Progr.* XLII, 185 (1954). — TSCHERMAK-WOESS, E.: *Karyologische Pflanzenanatomie, ein kritischer Überblick.* *Protoplasma* (Wien) **46**, 798 (1956).

WEBER, E.: *Grundriß der biologischen Statistik.* Jena: VEB. Gustav Fischer Verlag 1956. — WIPF, L.: Chromosome numbers in root nodules and root tips of certain Leguminosae. *Bot. Gaz.* **101**, 51 (1939). — WIPF, L., and D. C. COOPER: Chromosome numbers in nodules and roots of red clover, common vetch and garden pea. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **24**, 87 (1938). — Somatic doubling of chromosomes and nodular infection in certain Leguminosae. *Amer. J. Bot.* **27**, 821 (1940).

(Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell' Università di Pisa)

Qualche ricerca intorno a *Pichia fermentans* Lodder

per

J. A. ROSEMBERG *

Con 1 figura nel testo

(Eingegangen am 25. Oktober 1958)

Nel 1932 LODDER isolò da burro, nel Laboratorio di Microbiologia di Delft, una specie di *Pichia* differenziabile da *P. membranaefaciens* per la capacità di fermentare energicamente il glucosio: tale specie fu denominata *P. fermentans*. Da LODDER e KREGER VAN RIJ (1952) fu riconosciuto che a *P. fermentans* poteva riferirsi *P. dombrowskii* isolata da SACCHETTI (1933) da formaggio « stracchino » e *P. kluyveri* descritta da BEDFORD (1942) su isolamenti effettuati da Vaughen, in California, da olive.

Invero « *P. dombrowskii* differs from *P. fermentans* in the way of forming a pellicle on malt extract »; mentre « *P. kluyveri* differs from *P. fermentans* in the way of forming a pellicle on a medium with ethanol as sole source of carbon ». Ma tali caratteri — stante la loro variabilità — non sono stati ritenuti sufficienti a giustificare il mantenimento di specie distinte.

Per quanto ci consta *P. fermentans* è stata ancora rinvenuta in cacao in fermentazione e qualche volta anche in mosto d'uva.

Recentemente, procedendo allo studio di numerosi lieviti della regione viticola di S. Paolo in Brasile, ZARDETTO, TEIXEIRA e VERONA hanno avuto occasione di rinvenire con discreta frequenza specie di *Pichia* fermentanti energicamente il glucosio e pertanto riferibili, considerati anche gli altri caratteri, a *P. fermentans*¹.

Data tale frequenza è stato pensato opportuno, allora, eseguire su di un certo numero di ceppi qualche esame comparativo e soprattutto saggiare gli stessi ceppi dal punto di vista tecnologico con riferimento

* Borsista del Consiglio Nazionale delle Ricerche del Brasile.

¹ Oggi si conoscono altre specie di *Pichia* fermentanti energicamente il glucosio. E' ricordata *P. terricola* VAN DER WALT (1957) e *P. pijperi* VAN DER WALT et TSCHUSCHNER (1957). — La prima specie differisce da *P. fermentans* per le dimensioni più grandi delle cellule, una più decisa formazione di pseudomicelio e qualche carattere culturale. La seconda differisce per l'aspetto morfologico in quanto presenti cellule limoniformi.

alla produzione di alcool e alla formazione di acidità volatile e di acetato di etile. Queste ultime prove, per confronto, sono state estese anche ad alcuni ceppi di *P. membranaefaciens*.

Materiale e metodi

L'esame si è portato sopra i seguenti isolamenti:

Pichia fermentans

Ceppo n° 5 isolato da mosto, prima dell'inizio della fermentazione, ottenuto con uva proveniente dal vitigno IAC/358-1¹; ceppo n° 14 id. da uve del vitigno IAC/132-11; ceppo n° 18 id. da uva del vitigno IAC/358-1; ceppo n° 23 id. da uve del vitigno IAC/526-4; ceppo n° 27 isolato a fine fermentazione da mosto di uva Moscato; ceppo n° 32 isolato durante la fermentazione di un mosto ottenuto con uve del vitigno IAC/358-1; ceppo n° 35 id. da uve del vitigno IAC/73-3; ceppo n° 41 id. da uve del vitigno IAC/132-11; ceppo n° 45 isolato da mosto, all'inizio della fermentazione, ottenuto con uva del vitigno IAC/116-28; ceppo n° 64 id. da uve del vitigno IAC/121-44; ceppo n° 74 id. da uva del vitigno Seibel 8357; ceppo n° 121 id. da uve del vitigno IAC/164-20; ceppo n° 152 isolato da mosto, durante la fermentazione, ottenuto da uve del vitigno IAC/527-47; ceppo n° 155 id. da uve del vitigno IAC/21-14.

Pichia membranaefaciens

Ceppo n° 3 isolato da mosto, prima della fermentazione, ottenuto con uva del vitigno IAC/358-1; ceppo n° 8 id. da uve del vitigno IAC/526-5; ceppo n° 55 id. da uve del vitigno IAC/132-9; ceppo n° 71 id. da uve del vitigno IAC/135-10; ceppo n° 186 isolato durante la fermentazione da uve del vitigno Seibel 2 in zona di S. Roque; ceppo n° 223 isolato a fine fermentazione da mosto ottenuto da uve del vitigno Seibel 2 in zona di Jundiaí.

Lo studio dei caratteri necessari al riferimento sistematico è stato condotto secondo la nota metodica di LODDER e KREGER VAN RIJ.

Per le prove di fermentazione si è fatto uso di mosto d'uva contenente gr. 227/litro di zucchero e distribuito in quantità di cc. 250 in Erlenmeyer da cc. 500².

Tanto viene annotato avendo osservato che, la formazione di acidità volatile e, più ancora, di acetato di etile si trovano influenzate, a parità di volume del mosto, dalla superficie libera del liquido in contatto con l'aria. Alcune prove eseguite con i ceppi n° 5-18-32-45 coltivati in uguali quantità di mosto contenute in recipienti diversi hanno dato infatti, al 19° giorno, i risultati seguenti:

ceppo n°	cc. 250 di mosto in					
	matraci da cc. 300 rapporto vol./sup. = 10,5		matraci da cc. 500 rapporto vol./sup. = 3,7		matraci da cc. 1000 rapporto vol./sup. = 1,9	
	ac. volatile ‰	ac. etile mgr/litro	ac. volatile ‰	ac. etile mgr/litro	ac. volatile ‰	ac. etile mgr/litro
5	0.54	396	0.78	440	1.08	1.047
18	0.36	378	0.54	594	1.38	1.271
32	0.42	338	0.96	418	1.14	680
45	0.46	288	0.84	570	1.32	1.064

¹ Nella elencazione dei vitigni la sigla IAC indica Istituto Agronomico di Campinas (Brasile).

² Superficie libera del liquido = cm² 67; Rapporto: volume/superficie = 3.7.

E' evidente dunque la grande influenza del rapporto vol./sup. tanto che, facendosi tale rapporto relativamente basso, la quantità di acetato di etile sale notevolmente.

Notisi come, tale influenza, si faccia soprattutto sentire allorquando si passi dai recipienti medi ai recipienti grandi nonostante in questi la differenza di rapporto sia molto inferiore a quella esistente tra recipienti piccoli e recipienti medi.

Previa pastorizzazione i vari recipienti furono inoculati con ceppi di 48 ore cresciuti in agar-malto, e tenuti a temperatura ambiente (mesi di agosto-settembre) per la durata di 25 giorni.

Al 25° giorno fu determinato l'alcool e l'acidità volatile secondo i metodi ufficiali e l'acetato di etile con il metodo di PEYNAUD (1938).

Risultati

I caratteri rilevati ai fini sistematici sono stati trovati in buon accordo, sia per quanto si riferisce a *P. fermentans* che a *P. membranaefaciens* con quanto in LODDER e KREGER VAN RIJ.

Tabella 1. *Formazione di alcool, acidità volatile ed acetato di etile in alcuni ceppi di Pichia fermentans e di Pichia membranaefaciens*

	alcool % in volume	acidità volatile ‰ in ac. acetico	acidità volatile per cc. 100 di alcool	acetato di etile	
				meq.	mgr./litro
<i>Pichia fermentans</i>					
ceppo n° 5	4.58	0.42	0.92	8.20	721.6
14	5.86	0.60	1.02	9.80	862.4
18	3.64	0.60	1.64	4.87	428.5
23	3.85	0.42	1.09	0.25	22.—
27	5.70	0.60	1.05	3.97	349.4
32	5.63	0.68	1.20	4.—	352.—
35	5.78	0.42	0.72	2.45	215.6
41	5.10	0.30	0.58	8.05	708.5
45	6.16	0.66	1.07	6.40	563.2
64	4.58	0.27	0.59	0.30	26.4
74	5.03	0.54	1.07	0.32	29.3
121	5.10	0.42	0.82	0.87	77.—
152	5.18	0.36	0.69	8.1	712.8
155	5.48	0.36	0.65	2.75	242.—
<i>P. membranaefaciens</i>					
ceppo n° 3	1.07	0.24	2.24	0.25	24.6
8	2.34	0.60	2.56	0.37	33.—
55	0.73	0.66	9.—	1.17	15.4
71	0.73	0.36	4.93	0.10	8.8
186	—	0.24	—	0.15	13.2
223	—	0.54	—	0.20	17.6

Qualche leggera differenza tra i ceppi di *P. fermentans* è stata riscontrata solo nella formazione della pellicola, sia in malto che in mezzo minerale contenente etanolo come sorgente di carbonio. Difatti tale

pellicola si è presentata in malto ora più ora meno spessa; in etanolo, mentre tale formazione è stata in genere precoce in tre ceppi si è avuta con alquanto ritardo.

Per quanto si riferisce ai ceppi di *P. membranaefaciens* quattro di essi hanno fermentato molto lentamente e molto debolmente il glucosio. Probabilmente tra le forme non fermentanti di *P. membranaefaciens* e le forme energicamente fermentanti di *P. fermentans* esistono forme a comportamento intermedio.

Per quanto si riferisce alla formazione di alcool, di acidità volatile e di acetato di etile i risultati ottenuti figurano nella Tab.1.

Discussione

I dati raccolti offrono motivo a qualche considerazione.

Produzione di alcool etilico. L'attacco dello zucchero da parte di *Pichia fermentans* si manifesta rapido, ma si esaurisce anche in breve tempo dando origine a quantità d'alcool relativamente modeste.

Nei ceppi esaminati tali quantità sono state comprese tra il 3.64 e 6.16‰ in volume con una media — su 14 ceppi — di $5.11 \pm 0.18\%$.

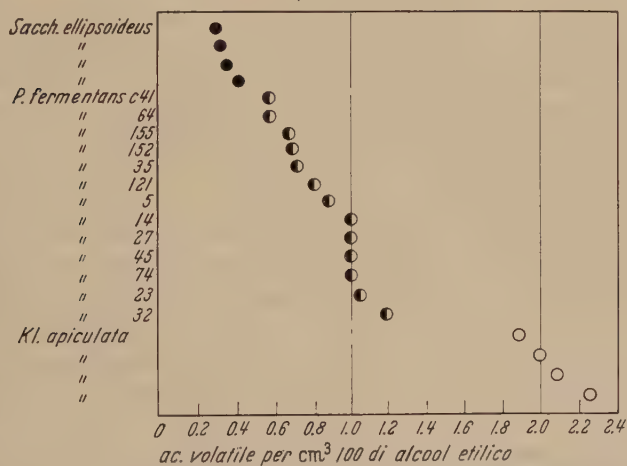


Fig.1. Produzione di acidità volatile per cc. 100 di alcool etilico in *Pichia fermentans* rispetto a quella prodotta da *Sacch. ellipsoideus* e da *Kloeckera apiculata*

Produzione di acidi volatili. La produzione di acidità volatile, di per sè considerata, assume valori quasi paragonabili, nella media, a quelli che di solito danno i lieviti ellittici. Infatti si è avuto come valore minimo lo 0.27% e come massimo lo 0.68% con una media dello $0.47 \pm 0.037\%$. Valutata, tale produzione, in rapporto all'alcool si osserva (escluso il risultato relativo al ceppo n° 18) che i valori ottenuti

si presentano intermediari tra quelli generalmente offerti da *Sacch. ellipsoideus* e da *Kl. apiculata* rispettivamente inferiori o molto superiori all'unità.

Produzione di acetato di etile. La produzione di acetato di etile da parte dei lieviti vinari è stata indagata da PEYNAUD (1956) su di un numero considerevole di specie.

Per quanto si riferisce al genere *Pichia* su sei ceppi di *P. membranaefaciens* e *P. fermentans* PEYNAUD ha trovato che la formazione di acetato di etile oscilla — relativamente ai sei ceppi — tra un minimo di 22 mgr/l ad un massimo di 440 mgr/l; contrariamente alle altre comuni specie entro una fascia, quindi, di notevole larghezza. I nostri dati confermano, in linea generale, i reperti di PEYNAUD; ma lasciano anche intendere una probabile differenza di comportamento tra *P. fermentans* e *P. membranaefaciens*.

Infatti abbiamo ottenuto:

	mgr/di acetato di etile
<i>P. membranaefaciens</i> (su 6 ceppi)	8.8— 33.0
<i>P. fermentans</i> (su 13 ceppi)	22.0—862.4

In altri termini, dei valori più elevati sembra maggiormente responsabile, delle due specie, *P. fermentans*. D'altra parte, nell'ambito di questa specie, sembrano individuabili rispetto a tale attitudine, tre gruppi distinti per comprendere in un primo gruppo i ceppi produttori quantità di ester che vanno fino a 200—300 mgr/l; in un secondo i ceppi che ne producono fino a mgr/l 600; in un terzo quelli che superano tali quantità.

I ceppi di quest'ultimo gruppo si avvicinano, nella produzione di esteri ad *Hansenula anomala*, specie che ha dato a PEYNAUD i seguenti valori in acetato di etile: minimo 737, massimo 990 mgr/l. Questi alti rendimenti, di molto superiori a quelli permessi dall' equilibrio chimico, unitamente al fatto che la formazione di esteri è legata alla respirazione provano come, in questi casi, la formazione di acetato di etile sia il risultato di una reazione energetica più che di « une réaction réversible s'effectuant par l'intermédiaire d'une esterase » (PEYNAUD 1956).

Zusammenfassung

Es werden die technologischen Eigenschaften einiger Stämme von *Pichia fermentans*, isoliert aus Traubenmost, untersucht.

Die Vergärung des Zuckers im Most beginnt rapide, wird jedoch bald eingestellt und ergibt einen Alkoholgehalt von im Mittel $5,11 \pm 0,18\%$.

Die Bildung flüchtiger Säuren ist nicht sehr stark; im Mittel werden $0,47 \pm 0,037\%$ erhalten.

Beim Vergleich der Säurebildung mit der Alkoholbildung zeigt *Pichia fermentans* eine Stellung zwischen *Sacch. ellipsoideus* und *Kloeckera apiculata*.

Die Bildung von Äthylacetat ist bisweilen gering, öfters reichlich. Es scheint möglich, daß innerhalb der Art Stämme mit geringer, mittlerer und starker Esterbildung sind. In letzterer Hinsicht nähern sich diese Stämme der Gattung *Hansenula*, die *Pichia* verwandt ist.

Ringrazio, per l'aiuto offertomi, il Signor Professore O. VERONA, Direttore dell'Istituto.

Bibliografia

BEDFORD, C. L.: Mycologia (N. Y.) **34**, 628 (1942). — LODDER, J.: Zbl. Bakt. II. Abt. **86**, 227 (1932). — LODDER, J., and N. J. W. KREGER VAN RIJ: The Yeasts. North Holland Publishing Comp. Amsterdam 1952. — PEYNAUD, E.: Ann. di Falsif. **31**, 158 (1938). — Ind. Agric. et Aliment. **73**, 253 (1956). — SACCHETTI, M.: Arch. Mikrobiol. **4**, 427 (1933). — VAN DER WALT, J. P.: Antonie v. Leeuwenhoek **23**, 23 (1957). — VAN DER WALT, J. P., und J. T. TSCHUCHNER: Antonie v. Leeuwenhoek **23**, 184 (1957).

(From the Department of Botany, The Durham Colleges in the University of Durham, England)

The Time-Scale of Mitosis in the Euglenineae

By

G. F. LEEDALE

(Eingegangen am 2. November 1958)

The cytological details of euglenoid mitosis have recently been described for 24 species, representing 13 genera, of the *Euglenineae* (LEEDALE 1958a). It was suggested that a non-spindle mitosis operates in this group of flagellates, the autonomous separation of sister chromatids being caused by mutual repulsion (see, also, LEEDALE 1958b). Evidence to support this theory comes from a study of the time-scale of euglenoid mitosis: that is, the duration of the mitotic stages and the velocity of the chromatids during anaphase. This evidence is summarised in the present paper.

I. Material and Methods

A. Species studied

Of more than 40 species grown in uni-algal, biphasic culture (PRINGSHEIM 1946a, 1946b; see LEEDALE 1958a for details of cultivation methods), measurements of the duration of mitosis were made for the following 8 species: *Astasia klebsii* Lemmermann; *Colacium mucronatum* Bourrelly; *Euglena gracilis* Klebs; *Euglena spirogyra* Ehrenberg; *Eutreptia viridis* Ehrenberg; *Lepocinclis ovum* var. *buetschlii* (Conrad) Huber-Pestalozzi; *Phacus pyrum* (Ehrenberg) Stein; *Trachelomonas grandis* Singh.

B. Cytological techniques

Living cells were mounted in their own culture medium beneath cover-glasses ringed with vaseline. Cells in division lost their flagella and became stationary. It was necessary to make the observations at night as mitosis occurred in biphasic tubes only during the dark period following a full period of natural daylight (LEEDALE 1959).

The mitosis was followed in the living cell by means of Reichert Anoptrel contrast at a magnification of $\times 1000$ ($\times 100$, N. A. 1.25 PhA Imm. objective, $\times 10$ oculars). The facts that the mitoses proceeded to completion and cell cleavage occurred, and that the stages of mitosis occupied much the same lengths of time in different cells of the same species, justify the assumption that the nuclear division is little affected by the treatment required to observe it.

II. Observations

The durations of the various stages of mitosis and cell cleavage are given in Table 1. The periods for which times are given are as follows (see LEEDALE 1958a):

A. Prophase: nuclear migration and nuclear changes until the start of endosome elongation.

B. Late prophase and metaphase: chromosome orientation and the first period of endosome elongation.

Table 1. *Duration of mitotic stages and anaphase velocity of chromatids in the Euglenineae at 20° C.*

Species	Duration of mitosis (mean values to nearest minute)								Maximum velocity of chromatids in anaphase (in μ per minute)	Number of cells
	A	B	C	D	E		F	G		
	Pro	Met	Anaphase		Tel			Cell cleavage		
<i>Astasia klebsii</i>	17	19	14	70	—	(120)	24	71	0.1	15
<i>Colacium</i> <i>mucronatum</i>	18	16	21	48	7	(110)	45	—	0.07	15
<i>Euglena gracilis</i>	17	12	71	15	4	(119)	23	110	0.1	34
<i>Euglena spirogyra</i>	25	20	44	19	2	(110)	41	28	0.12	12
<i>Eutrephia viridis</i>	8	29	19	40	—	(96)	delayed		0.1	15
<i>Lepocinclis ovum</i> var. <i>buetschlii</i>	14	17	28	19	1	(79)	24	19	0.06	5
<i>Phacus pyrum</i>	12	10	63	19	10	(114)	38	14	0.07	15
<i>Trachelomonas</i> <i>grandis</i>	8	17	27	63	12	(127)	7	6	0.15	5

(Pro = Prophase; Met = Metaphase; Tel = Telophase).

C. Early anaphase: early chromatid separation until a marked central gap is seen.

D. Late anaphase: chromatid separation and the second period of endosome elongation, the end of this stage being delimited by the end of chromatid separation and the breakdown of the central region of the endosome.

E. Telophase: two nuclei, no cell cleavage (except in *Astasia klebsii*).

F. From early to late cell cleavage.

G. Late cleavage separation of the two daughter cells: the time taken for rupture of the posterior connection.

As the periods of division occupy approximately the same length of time in different cells of the same species, one set of figures is given for each species, the mean times for the recorded number of cells.

III. Discussion

"It may be said that the duration of the various steps that compose a complex biological action will often throw much light on the underlying mechanism. This is probably true of mitosis also, though there is considerable difficulty in deciding what constitutes the steps of the cycle and how they are delimited" (SCHRADER 1953).

Despite the necessary caution conveyed by SCHRADER, the above measurements of the duration of mitotic stages in the *Euglenineae* may usefully be compared with those of other authors.

Most of the previous records agree with the present results, that euglenoid mitosis is a process lasting several hours. Mitosis lasts from 79 to 127 minutes in the eight species examined, and 110 or more minutes in six of these. Adding the time taken for cell cleavage to these values, the complete division process occupies from 2 to 4 hours. Records by other authors (of total division time only, no measurements of individual stages exist) are assembled in Table 2.

Table 2. *Duration of mitosis in the Euglenineae: records by other authors*

Species	Author	Total time for mitosis
<i>Colacium vesiculosum</i> Ehrenberg	JOHNSON 1934	1.5 hours
<i>Colacium vesiculosum</i>	SCHILLER 1924	40 sec. — 5 min.
" <i>Copromonas subtilis</i> Dobell"		
= <i>Scytomonas pusilla</i> Stein	DOBELL 1908	20 minutes
<i>Entosiphon sulcatum</i> (Duj.) Stein	LACKEY 1929	4—5 hours
" <i>Euglena agilis</i> Carter"		
= <i>Euglena gracilis</i>	BAKER 1926	4 hours
<i>Euglena deses</i> Ehrenberg	GOJDICS 1934	4 hours
<i>Euglena spirogyra</i>	RATCLIFFE 1927	3—4 hours
<i>Euglena</i> spp.	TANNREUTHER 1923	2 or 3—4 hours

The records of DOBELL (1908) and SCHILLER (1924) are anomalous. DOBELL's is for "amitosis" and cell cleavage (probably late mitosis and cleavage), SCHILLER's is probably for cleavage only. JOHNSON (1934) has suggested that SCHILLER must have thought that the telophase was the whole process of nuclear division. The two times recorded by TANNREUTHER (1923) are for transverse (2 hours) and longitudinal cleavage (3—4 hours). The first is a case of mis-identification or mis-observation.

The more interesting comparison is that between the present observations on the *Euglenineae* and the records for the duration of mitosis in living cells of other Protista and animal or plant tissues. Table 3 is a summary of such records for as wide a range of organisms as possible. Representative results are quoted from each source, in some cases (marked with an asterisk "*") as mean values of the recorded range of measurements. In the papers of BAJER (1953 onwards) the time quoted

Table 3. *The duration of mitosis in living cells*

Material	Author	Duration in minutes					
		Int	Pro	Met	Ana	Tel	Total
Protista:							
<i>Euglypha alveolata</i>	SCHEWIAKOFF 1887	—	35	20	20	25	100
<i>Chlamydomorphys minor</i>	BĚLAŘ 1921 a	—	3	2	2	6	13
<i>Pamphagus hyalinus</i>	„	—	10	6	2	60	78
<i>Rhogostoma schüssleri</i>	„	—	6	2—3	2.5	20	31
<i>Bodo lacertae</i>	BĚLAŘ 1921 b	—	10	10	12	27	59
<i>Actinophrys sol</i>	BĚLAŘ 1922	—	12	3—6	6	30	51—54
<i>Amoeba proteus</i>	BĚLAŘ 1926	—	—	5—10	11—16	—	—
<i>Euglypha</i> sp.	„	—	40	18	14	100	172
<i>Acanthocystis aculeata</i>	STERN 1924	—	8	4	5	23	40
Animal tissue:							
<i>Triton erythroblast</i>	JOLLY 1902	—	45	20	3	15	83
Tadpole tail mesenchyme	*CLARK 1912	—	75		4	4	83
Cat connective tissue	*LAMBERT and HANES 1913	—	35			5	40
Rat connective tissue	*LAMBERT 1913	—	18			4	22
Chick mesenchyme	*LEVI 1916	—	12.5	10.5	5	4.5	32.5
Chick mesenchyme	*LEWIS and LEWIS 1917	30— 120	45	6	2.5	8	61.5
Chick smooth muscle	„	—	17.5	8	2	4	31.5
<i>Paracentrotus lividus</i> egg	EPHRUSI 1926	—	4	7	6	—	—
<i>Drosophila</i> egg at 24° C.	RABINOWITZ 1941	3.4	4	0.3	1	0.9	6.2
Ditto at 30° C.	„	2.7	3	0.7	1.1	1.4	6.2
Chick tissue cultures; myoblasts or osteoblasts	HUGHES and SWANN 1948	—	—	—	3—4	—	—
<i>Rana</i> fibroblast	*HUGHES and PRESTON 1949	—	32	25	8.5		65
<i>Triton</i> liver fibroblast	„	—	18	27.5	20		65
Tumor cells from ascites sarcoma of rat, at 35° C.	MAKINO and NAKAHARA 1955	—	7	48	6	22	83
Ditto, at 38° C.	„	—	15	26	4	25	70
Ditto, at 40° C.	„	—	10	36	4	17	67

Table 3 (continued)

Material	Author	Duration in minutes					
		Int	Pro	Met	Ana	Tel	Total
Plant tissue:							
<i>Arrhenatherum</i>	*MARTENS 1927	—	40	8.5	17.5	27.5	93.5
<i>Tradescantia virginiana</i>	BĚLAŘ 1929	—	181	14	15	130	340
<i>Tradescantia virginiana</i> (tetraploid), at 20° C.	BARBER 1939	—	—	20	23	11	—
Ditto, at 35° C.	„	—	—	20	21	2	—
<i>Hymenophyllum tunbridgense</i>	*BAJER and MOLÈ-BAJER 1953a	—	180	47.5	26	—	—
<i>Ornithogalum umbellatum</i>	*BAJER and MOLÈ-BAJER 1954	—	—	17	21	22.5	—
<i>Asparagus pseudoscaberrimus</i>	„	—	44	10	10	23	87
<i>Zephyranthes candida</i>	„	—	110	20	24	32	186
<i>Iris aphylla</i>	„	—	—	22	15	26.5	—
<i>Pisum sativum</i>	„	—	40	20	12	16	88
<i>Helianthus annuus</i>	„	—	42.5	17	21.5	17.5	98.5
<i>Colchicum autumnale</i>	BAJER and MOLÈ-BAJER 1955	—	—	63	10	—	—

Int = Interphase; Pro = Prophase; Met = Metaphase (Metakinesis and the equatorial plate); Ana = Anaphase; Tel = Telophase.

for “metaphase” is subdivided into “metakinesis” and a short “metaphase” (the stage with a stationary metaphase plate).

Two features of these measurements are of special interest. The first is the relative duration of metaphase and anaphase, the second is the actual duration of these stages.

The times occupied by metaphase and anaphase in the mitotic process are compared, for material in which a full mitosis has been timed, in Table 4. This comparison brings out strikingly the fact that, whereas the relative duration of metaphase is of the same order in the *Euglenineae* as in other organisms and tissues, the relative duration of anaphase is much greater in the euglenoid species.

Reference to Tables 1 and 3 confirms that the actual duration of anaphase is also longer in the *Euglenineae* (47 to 86 minutes) than in any other Protistan for which records exist (2 to 20 minutes) or in any other plant or animal cell (1 to 26 minutes).

The reason for this is twofold. Firstly, anaphase in the *Euglenineae* is staggered (LEEDALE 1958a): the total time taken for anaphase is somewhat longer than the time taken for the passage of any one chromatid from equator to pole. Secondly, the anaphase velocity of individual chromatids is slower in the *Euglenineae* than in any other recorded mitosis.

Table 4. *The relative duration of metaphase and anaphase in living cells*

Material (cf. Tables 1 and 3)	Metaphase time as a percentage of mitosis	Anaphase time as a percentage of mitosis
	%	%
<i>Euglypha alveolata</i>	20	20
<i>Chlamydomorphys minor</i>	15	15
<i>Pamphagus hyalinus</i>	8	2.5
<i>Rhagothoma schüssleri</i>	10	8
<i>Bodo lacertae</i>	16.5	20
<i>Actinophrys sol</i>	11	11
<i>Euglypha</i> sp.	10.5	8
<i>Acanthocystis aculeata</i>	10	12.5
<i>Triton erythroblast</i>	25	4
Chick mesenchyme (LEVI 1916)	15.5	14
Chick mesenchyme (LEWIS and LEWIS 1917)	10	5
Chick smooth muscle	25	6
<i>Drosophila</i>	5	16
Tumour cells from ascites sarcoma of the rat, at 35° C.	58	7
Ditto, at 38° C.	37	6
Ditto, at 40° C.	54.5	6
<i>Arrhenatherum</i>	9	18.5
<i>Tradescantia virginiana</i>	4	4.5
<i>Asparagus pseudoscaberr</i>	8.5	8.5
<i>Zephyranthes candida</i>	11	13
<i>Pisum sativum</i>	23	14
<i>Helianthus annuus</i>	17	22
Euglenineae:		
<i>Astasia klebsii</i>	16	70
<i>Colacium mucronatum</i>	14.5	63
<i>Euglena gracilis</i>	10	71.5
<i>Euglena spirogyra</i>	18	57
<i>Eutreptia viridis</i>	30	61.5
<i>Lepocinclis ovum</i> var. <i>buetschlii</i>	21.5	59.5
<i>Phacus pyrum</i>	9	72
<i>Trachelomonas grandis</i>	13.5	71

Direct measurements of chromatids separating in anaphase, in the eight euglenoid species under study, show that the velocity is greater in the earlier stages of anaphase but in no species exceeds 0.15 μ per minute (Table 1). This value may be compared with velocities recorded for other material (Table 5).

Table 5. *Anaphase velocity of chromatids and chromosomes*

Material	Author	Temperature ° C	Velocity in μ per minute	
			Mean	Maximum
Animal tissue:				
Chick tissue culture	BUCCIANTE 1927	41	3.68	—
<i>Protenor</i> sperm	RIS 1943	25	—	1.3—1.6
<i>Tamalia</i>	"	25	—	0.7—2.0
<i>Thelia</i> (Mei. I)	"	25	—	0.4
Chick myoblasts	HUGHES and SWANN 1948	40	2—3	—
Chick osteoblasts	"	40	2—4	—
Grasshopper spermatocytes:				
<i>Chortophaga</i>	RIS 1949	17	—	0.4
Ditto	"	30	—	2.5
<i>Triton</i> fibroblasts	HUGHES and PRESTON 1949	26	3	5.8
<i>Rana</i> fibroblasts	"	26	2	4.5
<i>Xenopus</i> fibroblasts	"	26	1	2.1
Grasshopper spermatocytes:				
<i>Podisma sapporensis</i> (Mei. I)	MAKINO and NAKAHARA 1955	18—19	1.3	1.7
Ditto (Mei. II)	"	18—19	1.1	—
Grasshopper spermatocytes:				
<i>Acridium japonicum</i> (Mei. I)	"	18—19	1.2	—
Plant tissue:				
<i>Tradescantia virginiana</i>	BARBER 1939	10	0.3	0.35
Ditto	"	20	0.82	1.32
Ditto	"	30	0.75	1.16
<i>Hymenophyllum</i> <i>tunbridgense</i>	BAJER and MOLÈ-BAJER 1953b	20	c. 0.6	c. 1.3
<i>Ornithogalum</i> <i>umbellatum</i>	BAJER and MOLÈ-BAJER 1954	—	2—3	c. 2.8
<i>Asparagus</i> <i>pseudoscaberr</i>	"	—	1.5—2.5	c. 3.5
<i>Leucocum aestivum</i>	"	—	c. 1.6	c. 2.5
<i>Iris aphylla</i>	"	—	1—2	2
<i>Pisum sativum</i>	"	—	2—4	4
<i>Helianthus annuus</i>	"	—	2—2.7	3.5
<i>Haemanthus kathariniae</i>	BAJER 1954	—	0.7	1.2

All the organisms and tissues named in Tables 3 and 5 have a mitosis with a spindle: chromatid separation is due to centromeric repulsion and spindle action. It has previously been suggested (LEEDALE 1958a) that chromatid separation in the *Euglenineae* occurs without a spindle or centromeres, probably by a mutual repulsion of sister chromatids.

It is now suggested that the phenomena which cause the long anaphase in the mitosis of the *Euglenineae*, that is, the staggering of chromatid separation and the slow chromatid velocity, are further evidence for such a fundamental difference between the mechanism of euglenoid mitosis and that of the other mitoses considered in this account.

Summary

1. The duration of the several mitotic stages, and chromatid velocity during anaphase, have been timed in living cells of eight species of the *Euglenineae*.

2. The anaphase of euglenoid mitosis occupies from 47 to 86 minutes in different species (60—70% of the total mitosis time) as compared with from 1 to 26 minutes in all other organisms and tissues for which records exist (2.5—22% of the total mitosis time).

3. The absolute velocity of the chromatids separating in anaphase varies between 0.06 and 0.15 μ per minute in different euglenoid species, compared with between 0.3 and 6.0 μ per minute for all other recorded material.

4. These facts are claimed as evidence to support the theory that a non-spindle mitosis operates in the *Euglenineae*.

Literature

BAJER, A.: Cine-micrographic studies on mitosis in endosperm, I. Acta Soc. Bot. Poloniae **23**, 383—412 (1954). — BAJER, A., and J. MOLÉ-BAJER: Influence of extreme temperatures on mitosis in vivo. I. Acta Soc. Bot. Poloniae **22**, 267—298 (1953a), II. Acta Soc. Bot. Poloniae **22**, 577—586 (1953b). — Endosperm: material for study on the physiology of cell division. Acta Soc. Bot. Poloniae **23**, 69—110 (1954). — Cine-micrographic studies on mitosis in endosperm, II. Chromosome, cytoplasmic and brownian movements. Chromosoma (Berl.) **7**, 558—607 (1955). — BAKER, W. B.: Studies on the life history of *Euglena*, I: *Euglena agilis* Carter. Biol. Bull. **51**, 321—362 (1926). — BARBER, H. N.: The rate of movement of chromosomes on the spindle. Chromosoma (Berl.) **1**, 33—50 (1939). — BĚLAŘ, K.: Untersuchungen über Thecamöben der Chlamyophrysgruppe. Mit Benutzung des Nachlasses von H. SCHÜSSLER. Arch. Protistenk. **43**, 287 (1921a). — Protozoenstudien III. Arch. Protistenk. **43**, 431 (1921b). — Untersuchungen an *Actinophrys* sol Ehrenberg, I. Die Morphologie des Formwechsels. Arch. Protistenk. **46**, 1 (1922). — Der Formwechsel der Protistenkerne. Ergebn. Zool. **6**, 235—654 (1926). — Beiträge zur Kausalanalyse der Mitose, III. Untersuchungen an den Staubfadenhaarzellen und Blattmeristemzellen von *Tradescantia virginiana*. Z. Zellforsch. **10**, 73—134 (1929). — BUCCIANTE, L.: Ulteriori ricerche sulla velocità della mitosi nelle cellule coltivate in funzione della temperatura. Arch. exp. Zellforsch. **5**, 1—24 (1927).

CLARK, E. R.: Further observations on living growing lymphatics: their relation to the mesenchyme cells. Amer. J. Anat. **13** (1912).

DOBELL, C. C.: The structure and life-history of *Copromonas subtilis*, nov. gen. et nov. spec.: a contribution to our knowledge of the Flagellata. Quart. J. micr. Sci. **52**, 75—120 (1908).

EPHRUSSI, B.: Sur les coefficients de température des différentes phases de la mitose des œufs d'oursin (*Paracentrotus lividus* Lk.) et de l'*Ascaris megalocephala*. *Protoplasma* (Berl.) **1**, 105—123 (1926).

GOJDICS, M.: The cell morphology and division of *Euglena deses* Ehrbg. *Trans. Amer. micr. Soc.* **53**, 299—310 (1934).

HUGHES, A. F. W., and M. M. SWANN: Anaphase movements in the living cell. *J. exp. Biol.* **25**, 45—70 (1948). — HUGHES, A. F. W., and M. M. E. PRESTON: Mitosis in living cells of amphibian tissue cultures. *J. roy. micr. Soc.* **69**, 121—131 (1949).

JOHNSON, D. F.: Morphology and life-history of *Colacium vesiculosum* Ehrenberg. *Arch. Protistenk.* **83**, 241—263 (1934). — JOLLY, J.: Sur la durée des phases de la division indirecte. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **54**, 1338 (1902).

LACKEY, J. B.: Studies on the life histories of Euglenida, I. The cytology of *Entosiphon sulcatum* (Duj.) Stein. *Arch. Protistenk.* **66**, 176—200 (1929). — LAMBERT, R. A.: Comparative studies upon cancer and normal cells, II. The character of growth in vitro with special reference to cell divisions. *J. exp. Med.* **17** (1913). — LAMBERT, R. A., and F. M. HANES: Beobachtungen an Gewebeskulturen in vitro. *Virchows Arch. path. Anat.* **211** (1913). — LEEDALE, G. F.: Nuclear structure and mitosis in the Euglenineae. *Arch. Mikrobiol.* **32**, 32—64 (1958a). — Mitosis and chromosome numbers in the Euglenineae (Flagellata). *Nature* (Lond.) **181**, 502—503 (1958b). — Periodicity of mitosis and cell division in the Euglenineae. *Biol. Bull.* (in press) (1959). — LEVI, G.: Il ritmo e le modalità della mitosi nelle cellule viventi coltivate 'in vitro'. *Arch. ital. Anat. e Embr.* **15**, 243—264 (1916). — LEWIS, W. H., and M. R. LEWIS: The duration of the various phases of mitosis in the mesenchyme cells of tissue cultures. *Anat. Rec.* **13**, 359—367 (1917).

MAKINO, S., and H. NAKAHARA: A study of cell division by phase microscopy. *J. Hered.* **46**, 245—251 (1955). — MARTENS, P.: Recherches expérimentales sur la cinèse dans la cellule vivante. *Cellule* **38**, 67—174 (1927).

PRINGSHEIM, E. G.: "Pure Cultures of Algae", Cambridge Univ. Press. 1946a. — The biphasic or soil-water culture method for growing algae and flagellata. *J. Ecology* **33**, 193—204 (1946b).

RABINOWITZ, M.: Studies on the cytology and early embryology of the egg of *Drosophila melanogaster*. *J. Morph.* **69**, 1—50 (1941). — RATCLIFFE, H. L.: Mitosis and cell division in *Euglena spirogyra* Ehrenberg. *Biol. Bull.* **53**, 109—122 (1927). — RIS, H.: A quantitative study of anaphase movement in the aphid *Tamalia*. *Biol. Bull.* **85**, 164—178 (1943). — The anaphase movement of chromosomes in the spermatocytes of the grasshopper. *Biol. Bull.* **96**, 90—106 (1949).

SCHIEWIAKOFF, W.: Über die karyokinetische Kernteilung der *Euglypha alveolata*. *Morph. Jb.* **13**, 193 (1887). — SCHILLER, J.: Beitrag zur Kenntnis des Pflanzenlebens mitteleuropäischer Gewässer, II. Über *Colacium vesiculosum* E. *Öst. bot. Z.* **73**, 1—23 (1924). — SCHRADER, F.: „Mitosis“, 2nd Edn, Columbia Univ. Press, New York 1953. — STERN, C.: Untersuchungen über Acanthocystideen. *Arch. Protistenk.* **48**, 436 (1924).

TANNREUTHER, G. W.: Nutrition and reproduction in *Euglena*. *Arch. Entwickl.-Mech. Org.* **52**, 367—383 (1923).

(Aus dem Hygiene-Institut der Universität Mainz)

Der Einfluß von Antibiotica auf die Überlebensrate von Mikroorganismen bei tiefen Temperaturen *

Von

G. GILLISSEN und E. HEUSEL

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. November 1958)

Für die Wirkung antibakterieller Stoffe ist neben anderen Faktoren auch die Temperatur von großer Bedeutung (Übersicht siehe ESELTINE u. RAHN 1949). Die Versuchstemperaturen lagen bei den diesbezüglichen Arbeiten zwischen 15° C und 42° C, wenn man von der Zugabe von Desinfektionsmitteln zum Kochwasser bei der Instrumentendesinfektion absieht. Auch bei der Austestung von Antibiotica liegen die Versuchstemperaturen meist in Bereichen, die ein Wachstum der Testorganismen erlauben. Dies ist verständlich, da die Antibioticawirkung fast immer im Verhältnis zum Zellstoffwechsel untersucht wurde (HOBBY, MEYER u. CHAFFEE 1942, GROSS 1955, RAMSEY 1957 u. a.).

Tiefe Temperaturen wurden verwendet bei Untersuchungen zur Gefriertrocknung von Mikroorganismen (HÖRTER 1958, HELLER 1941, ATA u. STAIB 1957 u. a.). REEVES u. HARRISON (1957) untersuchten den Einfluß von Temperaturen zwischen +15° C und -22° C bei einer Kochsalzkonzentration im Suspensionsmedium der Keime, die eine Eisbildung verhinderte, auf die Überlebensrate von *E. coli*. Ausgehend von diesen Erfahrungen untersuchten wir die Kinetik der Absterberate von grampositiven und gramnegativen Keimen bei Temperaturen zwischen +4° C und -19° C und einer Versuchsdauer bis zu 6 Tagen in Anwesenheit von Penicillin (Pc) und Streptomycin (Str). Gleichzeitig wurde untersucht, ob die nach längerer Zeit in überbakteriostatischen Antibioticakonzentrationen überlebenden Keime resistente Varianten der ursprünglichen Keimpopulation sind.

Material und Methoden

Als Testkeime dienten *M. pyogenes* var. *aureus* Sg 511 (Sg), sowie ein Stamm *E. coli* aus der Routinediagnostik mit typischen fermentativen Leistungen.

20 Std alte Bouillonkulturen dieser Testkeime wurden nach Waschen und Wiederaufnehmen mit Bouillon auf das ursprüngliche Volumen im Verhältnis von

* Die Untersuchungen wurden durch Mittel ermöglicht, die von der Landesversicherungsanstalt Rheinland-Pfalz in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt wurden.

9 Teilen + 1 Teil mit Aqua dest. (Kontrolle) bzw. mit Pc- oder Str-Lösung (Versuch) verdünnt. Bei Verwendung von *Sg* wurden Ansätze mit Pc-Endkonzentrationen von 0,1—0,04—0,02 und 0,01 E Pc/ml sowie mit Str-Endkonzentrationen von 10, 4, 2 und 0,5 $\mu\text{g/ml}$ benutzt. Die mittlere Sensibilität (Bakteriostase) des Teststammes betrug 0,04 E Pc/ml bzw. 3,75 $\mu\text{g Str/ml}$.

Bei Verwendung von *E. coli* wurden Ansätze mit Pc-Endkonzentrationen von 20000, 900, 450 und 225 E Pc/ml bzw. Str-Endkonzentrationen von 10, 4, 2 und 0,5 $\mu\text{g/ml}$ benutzt. Die mittlere Sensibilität (Bakteriostase) dieses Stammes betrug 937 E Pc/ml bzw. 0,94 $\mu\text{g Str/ml}$.

Von den Kontrollansätzen wurde sofort nach Herstellung ein kleinerer Teil 2 min in der Kühlzentrifuge bei 600 · g zentrifugiert, das Keimsediment mit demselben Volumen frischer Bouillon aufgenommen und damit nach Vorverdünnung auf $0,2 \cdot 10^{-6}$ eine sogenannte Lebendkeimzahlbestimmung sowie eine Resistenzbestimmung nach Vorverdünnung auf 10^{-2} durchgeführt.

Aliquote Anteile der Kontroll- und der Versuchsansätze wurden in Zentrifugengläser abgefüllt und von jedem Ansatz 3 Proben sowohl bei $+4^\circ \pm 1^\circ \text{C}$ als auch bei $-5^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ und bei $-19^\circ \pm 1^\circ \text{C}$ aufbewahrt. Nach einer Aufbewahrungszeit von 1, 3 und 6 Tagen wurde je eine Probe entnommen, zentrifugiert (siehe oben), zur Entfernung des Antibioticums mit Bouillon gewaschen, mit Bouillon auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und nach Vorverdünnung auf 10^{-2} eine Resistenzbestimmung sowie nach entsprechender Vorverdünnung eine sogenannte Lebendkeimzahlbestimmung auf Agarplatten durchgeführt.

Die Resistenzbestimmung erfolgte im Reihenverdünnungstest mit geometrischen Verdünnungsstufen. Als Ausdruck der Resistenz bzw. des Sensibilitätsgrades wurde die nach dieser Methode ermittelte kleinste Wirkstoffkonzentration angegeben, die im Mittel noch eine Bakteriostase nach 20stündiger Bebrütung ergab. Dazu wurde die Konzentration zwischen dem letzten nicht bewachsenen und dem ersten deutlich bewachsenen Röhrchen errechnet. Die Wirkstoffkonzentration der Testlösungen wurde mit Teststämmen kontrolliert.

Bei der sogenannten Lebendkeimzahlbestimmung wurde nach entsprechender Vorverdünnung der gewaschenen Keimsuspension lediglich die im Mittel je Volumeneinheit festgestellte Zahl von Kolonien erfaßt. Diese Zahl ist besonders bei *M. pyogenes* wegen der Klonbildung der Keime bedeutend kleiner als die wirklich vorhandene Zahl lebender Zellen. Die Methode ist aber für vergleichende Versuche durchaus anwendbar. Im einzelnen wurde so vorgegangen, daß von der Vorverdünnung bei jeder Bestimmung auf 10 Agarplatten (Durchmesser 10 cm) je 0,3 ml gegeben wurden. In den Tabellen ist der \log_{10} der mittleren Koloniezahl je Milliliter angegeben.

Ergebnisse

Die bei den Versuchen ermittelten Koloniezahlen sind in Tab. 1 u. 2 sowie in Abb. 1 u. 2 wiedergegeben (\log_{10} Koloniezahl je Milliliter).

Aus Abb. 1 ist zu entnehmen, daß bei *E. coli* die Konzentration an Lebendkeimen bei -19°C in Abwesenheit eines Antibioticums (Kontrolle) besonders bis zum 1. Tag sehr schnell abnimmt. Zwischen dem 3. und 6. Tag bleibt die Konzentration an Lebendkeimen unter diesen Bedingungen praktisch konstant. Bei -5°C bleibt die Lebendkeimzahl fast unverändert, während bei $+4^\circ \text{C}$ ein kleiner Anstieg zu verzeichnen ist.

Vergleicht man die Wirkung verschiedener Streptomycinkonzentrationen in den einzelnen Temperaturbereichen, dann nimmt in jedem

Tabelle 1. *Einfluß von Penicillin auf die Lebendkeimzahl von M. pyogenes var. aureus bei tiefen Temperaturen*

		Penicillinkonzentration in E Pc/ml				
		0 (Kontrolle)	0,01	0,02	0,04	0,1
+4°	0	9,19	—	—	—	—
	1	9,09	9,04	8,95	8,90	8,85
	3	9,06	9,09	9,02	9,04	9,02
	6	8,93	8,88	8,88	8,87	8,75
-5°	1	9,00	9,01	8,97	8,83	8,82
	3	8,90	8,91	—	8,72	8,75
	6	8,85	8,82	8,80	8,75	8,73
-19°	1	9,02	9,09	8,95	8,95	8,96
	3	9,06	9,08	9,02	8,96	9,00
	6	8,98	8,94	8,95	8,91	8,85

Tabelle 2. *Einfluß von Streptomycin auf die Lebendkeimzahl von M. pyogenes var. aureus bei tiefen Temperaturen*

		Streptomycinkonzentration in µg/ml				
		0 (Kontrolle)	0,5	2	4	10
+4°	0	9,12	—	—	—	—
	1	9,05	9,11	9,11	9,10	9,10
	3	—	8,86	8,87	8,90	8,87
	6	8,85	8,81	8,82	8,78	8,75
-5°	1	9,02	8,98	9,01	9,02	8,96
	3	8,85	8,74	8,75	8,78	8,71
	6	8,67	8,67	8,67	8,64	8,67
-19°	1	9,07	8,95	9,05	9,05	8,95
	3	8,95	8,93	8,92	8,90	8,82
	6	8,86	8,90	8,91	8,91	8,79

Fall die Lebendkeimzahl mit wachsender Streptomycinkonzentration ab. Auch hier ist wie bei der Kontrolle festzustellen, daß nach dem 3. Versuchstag die Keimzahl praktisch konstant bleibt. Hervorzuheben ist ferner, daß subbakteriostatische Streptomycinkonzentrationen bei +4° C und bei -5° C gegenüber der Kontrolle nahezu ohne Effekt sind, bei -19° C aber eine deutliche Verminderung der Keimzahl bewirken. Der Effekt der höchsten Streptomycinkonzentration ist bei +4° C und bei -19° C vergleichbar. Bei -5° C ist dieselbe Konzentration sehr viel weniger wirksam, was bei dem nachfolgend beschriebenen Versuch mit Pc ebenfalls zu beobachten ist.

Bei Verwendung von Pc (Abb. 2) in subbakteriostatischen bis überbakteriostatischen Konzentrationen kann man grundsätzlich die

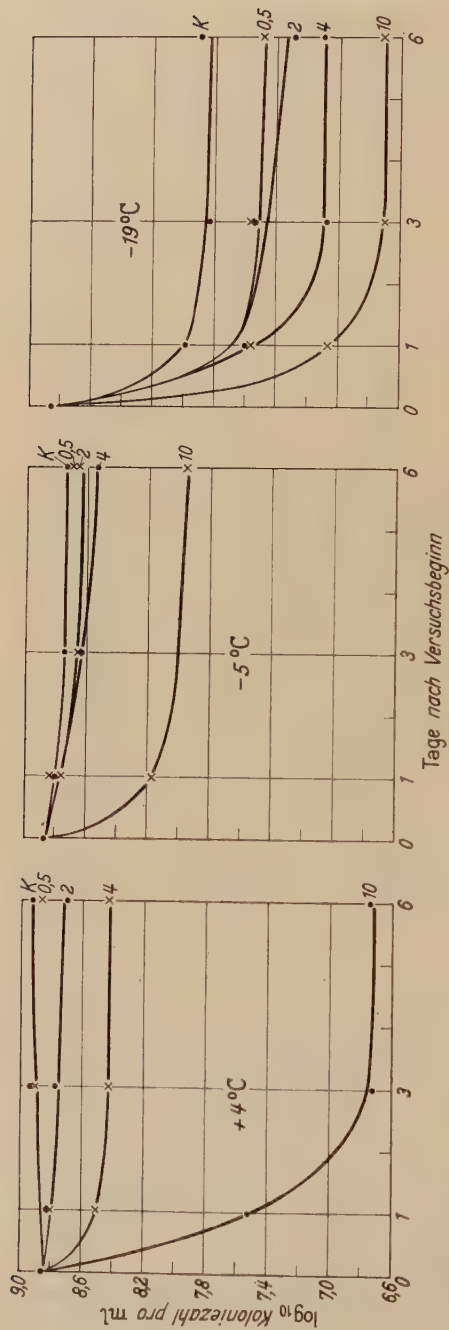


Abb. 1. Einfluß von Streptomycin auf die Absterbekinetik von *E. coli* (die bei den Kurven angegebenen Ziffern bedeuten die Wirkstoffkonzentration)

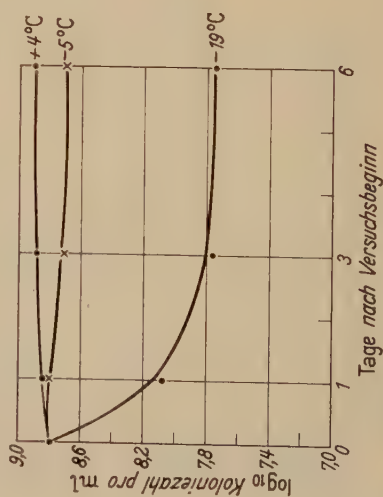


Abb. 1a. Einfluß tiefer Temperaturen auf die Absterbekinetik von *E. coli* (Kontrollen ohne Penicillinzusatz)

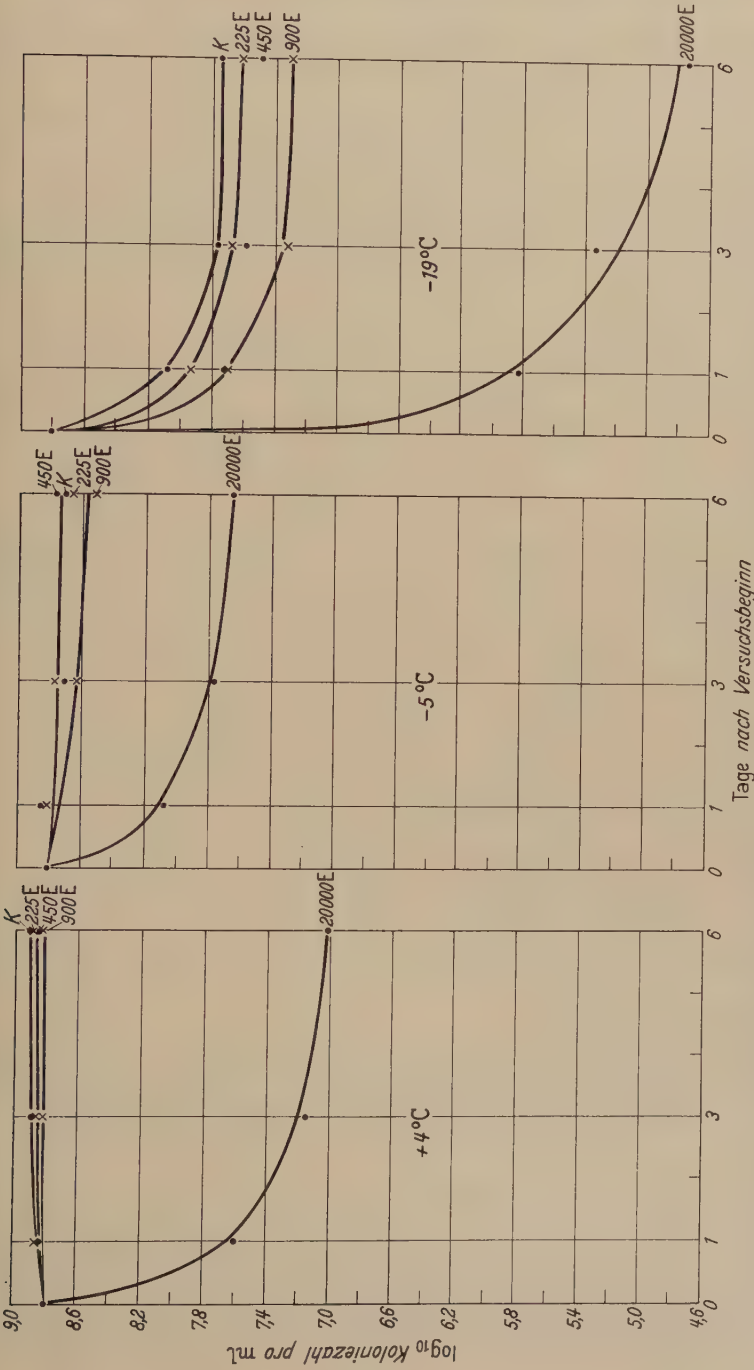


Abb. 2. Einfluß von Penicillin auf die Absterbekinetik von *E. coli* (die bei den Kurven angegebenen Ziffern bedeuten die Wirkstoffkonzentration)

gleichen Aussagen machen. Lediglich bei -19°C ist die Wirkung der höchsten Pc-Konzentration nennenswert ausgeprägter als bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Gegensatz zum Str-Versuch.

Die gleichzeitig durchgeführten Resistenzprüfungen sind insofern von Interesse, als in allen 3 Temperaturbereichen zwischen dem 3. und 6. Versuchstag auch bei den höchsten Antibioticakonzentrationen die Keimzahl kaum mehr abnahm und die Keime demnach trotz mehrfach überbakteriostatischer Wirkstoffkonzentration überleben, obwohl die Keimkonzentration zu Versuchsbeginn von dieser Wirkstoffkonzentration beeinflußt wurde.

Die Resistenzbestimmung der Colibakterien ergab beim Str-Versuch eine mittlere Sensibilität von $0,94\text{ }\mu\text{g}$ Str/ml entsprechend der unter Standardbedingungen getesteten ursprünglichen Stammsensibilität. Ausnahmen bildeten die Austestungen am 1., 3. und 6. Tag der Versuche bei $+4^{\circ}\text{C}$, -5°C und -19°C mit der höchsten (vor der Resistenzprüfung ausgewaschenen) Str-Konzentration von $10\text{ }\mu\text{g/ml}$, sowie die Austestungen vom 1., 3. und 6. Tag der Versuche bei -19°C und $4\text{ }\mu\text{g}$ Str/ml. In diesen Fällen wurde eine mittlere Sensibilität von $0,47\text{ }\mu\text{g}$ Str/ml gemessen. Im Gegensatz zu einer höheren Resistenz, die bei den in Antibioticalösung überlebenden Keimen erwartet wurde, wurde also scheinbar eine Resistenzminderung beobachtet, die allerdings nur eine Verdünnungsstufe betrug.

Dasselbe Ergebnis war noch deutlicher zu beobachten beim Versuch mit *E. coli* und Pc. Bei diesem Versuch blieb der mittlere Sensibilitätswert des Ausgangsstammes von 973 E Pc/ml lediglich erhalten am 1.—6. Tag bei $+4^{\circ}\text{C}$ in der Kontrolle und am 1. und 3. Tag bei $+4^{\circ}\text{C}$ in den Versuchen mit 225—900 E Pc/ml. Bei der höchsten Pc-Konzentration fiel die Sensibilität in allen Temperaturbereichen bis auf 11 E Pc/ml ab. Mit die tiefsten Werte von 46,8 Pc/ml und weniger wurden bei allen Pc-Konzentrationen bei -20°C am 1.—6. Tag beobachtet. Auch bei diesem Pc-Versuch war also eine scheinbare Resistenzminderung festzustellen.

Der Versuch mit *M. pyogenes* (Tab. 1 u. 2) ergab ein völlig anderes Bild als der mit Colibakterien. Bei längerer Aufbewahrung ist eine ganz geringe Abnahme der Lebendkeimzahl (Koloniezahl) in den Kontrollen ohne Antibioticazusatz zu beobachten, die jedoch in den gewählten Temperaturbereichen von $+4^{\circ}\text{C}$ bis -19°C ähnlich ist. Der Gegensatz zum entsprechenden Versuch mit *E. coli* ist eindeutig. Zugaben von Pc in Konzentrationen von $\frac{1}{4}$ bis zum 2,5fachen der Hemmkonzentration bewirken ebenso wie Zugaben von Str in subbakteriostatischen bis überbakteriostatischen Konzentrationen gegenüber den Kontrollen eine ganz geringe, gegenüber den entsprechenden Versuchen mit *E. coli* eine unbedeutende Abnahme der Keimzahl. Die bei diesen Versuchs-

serien ebenfalls durchgeführten Resistenzbestimmungen ergaben weder mit Pc noch mit Str eine Veränderung der mittleren Sensibilität des Ausgangsstammes.

Diskussion

Innerhalb von 6 Versuchstagen nimmt die Lebendkeimzahl von *E. coli* bei einer Aufbewahrung der Suspension bei $+4^{\circ}\text{C}$ etwas zu, bleibt bei -5°C fast stationär und nimmt bei -19°C deutlich ab. Diese Kontrollversuche bestätigen die Ergebnisse von REEVES u. HARRISON (1957). Str- und Pc-Zugaben in sub- und in überbakteriostatischen Konzentrationen bewirken in jedem Temperaturbereich eine Verminderung der Lebendkeimzahl, wobei subbakteriostatische Str-Konzentrationen bei -19°C , nicht aber bei $+4^{\circ}\text{C}$ oder bei -5°C eine zusätzliche Wirkung haben. Die Beobachtung, daß die höchsten Str- und Pc-Konzentrationen den besten Effekt bei $+4^{\circ}\text{C}$ und bei -19°C haben, die kleinste Wirkung aber bei -5°C auftritt, kann vielleicht durch die Kontrolle erklärt werden. Bei $+4^{\circ}\text{C}$ tritt eine langsame Zellvermehrung ein, wobei der Stamm wenigstens auf sehr hohe Antibiotikakonzentrationen besser anspricht (HOBBY u. DAWSON 1944) als bei -5°C mit ziemlich konstanter Keimkonzentration. Der bei -19°C beobachtete starke Abfall der Keimzahl kann gleichzeitig ein Hinweis für eine erhöhte Permeabilität sein, was zu einem besseren Effekt hoher Antibiotikakonzentrationen führen kann.

Die Resistenzprüfung zeigt bei diesem Versuch nur dann eine scheinbare Resistenzminderung, wenn die Konzentration an Keimen besonders klein ist. Da die Inokulumgröße aber eine besondere Rolle spielt bei Penicillinasebildnern (RANTZ u. KIRWY 1944, SPINK u. FERRIS 1947, LURIA 1946), ist die scheinbare Resistenzminderung im Falle von *E. coli* und Pc besonders groß. Die in den Antibioticalösungen der Versuche überlebenden Keime besitzen also keine genetisch fixierte, gegen den Ausgangsstamm erhöhte Resistenz, noch erfahren sie eine Resistenzminderung.

Im Gegensatz zu *E. coli* zeigt sich *M. pyogenes* gegen die Temperaturbedingungen des Versuchs sehr widerstandsfähig, worauf auch die Ergebnisse von HÖRTER (1958) mit der Gefriertrocknung hinweisen. Dementsprechend sind in den Temperaturbereichen von $+4^{\circ}\text{C}$ bis -19°C auch die Antibioticawirkungen nur sehr gering.

Zusammenfassung

Die Lebendkeimzahl in einer Suspension von *E. coli* nimmt bei $+4^{\circ}\text{C}$ langsam zu, nimmt bei -5°C wenig ab und fällt bei -19°C innerhalb von 24 Std stark, während die Verringerung in den folgenden Tagen nur noch gering ist. Streptomycin und Penicillin vermindern in allen 3 Temperaturbereichen die Keimkonzentration in Abhängigkeit von der

Antibioticumkonzentration. Subbakteriostatische Konzentrationen von Streptomycin haben bei -19°C eine zusätzliche Wirkung. Die Resistenz der in überbakteriostatischen Antibioticakonzentrationen bei diesen Temperaturen überlebenden Keime ist gegenüber dem Ausgangsstamm weder erhöht noch vermindert.

M. pyogenes wird durch die gleichen Temperaturen verhältnismäßig wenig beeinflusst. Auch mehrfach überbakteriostatische Konzentrationen von Penicillin und Streptomycin haben unter diesen Versuchsbedingungen kaum eine Wirkung. Die Resistenz der überlebenden Keime ist gegenüber dem Ausgangsstamm nicht verändert.

Literatur

- ATA, S., u. F. STAIB: Internat. Z. Vitaminforsch. **28**, 1/2, 157 (1957). — Zbl. Bakt., II. Abt. **110**, 659 (1957). — ESELTINE, W. P. VAN, and O. RAHN: J. Bact. **57**, 547 (1949). — GROSS: Biochim. biophys. Acta **18**, 452 (1955); zit. RAMSEY. — HILLER, O.: J. Bact. **41**, 109 (1941). — HOBBY, G. L., and M. W. DAWSON: Proc. Soc. exp. Biol. **56**, 178, 181 (1944). — HOBBY, G. L., K. MEYER and E. CHAFFEE: Proc. Soc. exp. Biol. **50**, 281 (1942). — HÖRTER, R.: Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **171**, 526 (1958). — LURIA, S. E.: Proc. Soc. exp. Biol. **61**, 46 (1946). — RAMSEY, H. H.: J. Bact. **73**, 689 (1957). — RANTZ, L. A., and W. M. M. KIRBY: J. Immunol. **48**, 335 (1944). — REEVES, H. C., and A. P. HARRISON jr.: Proc. Soc. exp. Biol. **95**, 278 (1957). — SPINK, W. W., and V. FERRIS: J. clin. Invest. **26**, 379 (1947).

(Chemistry Department, Allahabad University, Allahabad, India)

The Influence of Iron, Sulphite and Paraformaldehyde on the Formation of 2.3 Butanediol in the Cultures of *Bacillus polymyxa*

By

KRISHNA BAHADUR and S. RANGANAYAKI

(Eingegangen am 8. November 1958)

The production of 2.3 butanediol by various microorganisms (LEDINGHAM et al. 1945, UNDERKOFER 1948) and its formation in animal tissues (JARNEFELT 1955) have been much studied. 2.3 butanediol received added attention due to the increasing demand for rubber which stimulated the attempts to produce synthetic material resembling rubber in physical and chemical properties. 2.3 butanediol can easily be dehydrated to 2.3 butadiene which is the basic material for the formation of the Buna type of synthetic rubber.

A rigorous search is being made to pick out such microorganisms which produce a considerable quantity of 2.3 butanediol side by side with an earnest effort to investigate the mechanism of its formation, so that it may be possible to increase the yield of the glycol by activating the enzymes which help in its formation and inhibiting those which hinder it. It has been suggested that glycol is formed only as a reserve food for the organism (HOOREMAN 1950) and that it is reutilised subsequently by the organism. The conditions which favour the growth of the organisms usually do not favour the formation of the glycol (MCALL and GEORGI 1954). This indicates that the glycol is formed only by a secondary reaction which starts under conditions unfavourable to cell growth.

In this paper, we have investigated the role of ferric ions, sulphite ions and paraformaldehyde on the formation of 2.3 butanediol in the cultures of *Bacillus polymyxa*. The effect of iron on the fermentation and metabolism of some micro-organisms has been studied by some workers. The medium in which the formation of 2.3 butanediol is favoured has its oxidation-reduction potential towards reduction side. It has been reported that iron inhibits the production of riboflavin by *Torulopsis*, *Candida* and *Clostridium acetobutylicum* and iron behaves as a hydrogen carrier system (HICKY 1945).

Investigating the role of iron on *Corynebacterium diphtheriae*, PAPPENHEIMER (1947) and PAPPENHEIMER and HENDEE (1947) reported that the growth, toxin production and porphorin production by the organism

were slight with low level of iron. As iron was supplied toxin and porphorin production soon reach a maximum and additional iron caused both to fall sharply while growth continued to increase. The cells grown in optimum level of iron showed a two band cytochrome system that was absent in iron deficient cells.

Iron was found to influence considerably the products formed by breaking up of glucose by *Clostridium perfringens* (PAPPENHEIMER and SHASKAN 1944). In the absence of iron lactic acid fermentation results. The presence of iron brings about the formation of acetate, butyrate, ethyl alcohol, hydrogen and carbon dioxide. Due to the reducing conditions present in the cultures of *Sporovibrio desulfuricans* sulphate is converted into sulphide. Here we have made an effort to investigate the influence of sulphite ion on the formation of 2,3 butanediol in *B. polymyxa* cultures and thereby on the reducing environment of the culture. Similarly the effects of iron and formaldehyde have been studied.

Experimental

Four culture media each containing K_2HPO_4 0.70 gm.; KH_2PO_4 0.30 gm.; $MgSO_4$ 0.16 gm.; $(NH_4)_2SO_4$ 0.34 gm. and sugar 10 gm. were prepared. The different chemicals whose effect was to be studied were added in amounts indicated in the tables. The volume of each was 150 c. c. Flat bottom sigcol flasks of 250 c. c. capacity were used for the purpose. The flasks were cotton plugged and sterilised in an autoclave for 20 minutes at 15 lb. pressure. The culture media were incubated at 30° C for 24 hours and then reesterilised. Each was seeded with 50 c. c. of an actively growing culture of *B. polymyxa*. This seed culture was analysed for its contents. The cultures were allowed to incubate at 30° C for 10 days. With a sterilised pipette 50 c. c. of each culture was taken out and analysed, taking due precautions to avoid infection of the culture during transfer. Analyses were carried out 30 days after seeding and also 50 days after seeding.

Reducing sugar present in the culture was estimated by direct titration with standard Fehling's solution at boiling point using methylene blue as indicator near the end point. Total sugar was estimated as follows: 5 c. c. of the culture was hydrolysed by boiling for half a minute with dilute hydrochloric acid. To this after neutralisation of the acid, excess Fehling's solution was added and boiled. The precipitated copper oxide was filtered and washed and dissolved in ferric sulphate. The ferrous sulphate formed was titrated against standard dichromate. From the results the amount of sugar in the whole culture was calculated. Butanediol present in the culture was estimated by the method of MOUREU and DODE (1934). The results obtained are tabulated below. While calculating, the amount of sugar etc., present in the seed culture was also taken into account.

Discussion

The quantity of reducing sugar present in the controlled culture of *B. polymyxa* decreases between 10 and 30 days of fermentation but the quantity of reducing sugar in the culture slowly increases between 30 and 50 days. Though the culture containing paraformaldehyde follows the same trend, in the culture containing sulphite or iron the

Observations

Table 1. *The effect of iron, sulphite and paraformaldehyde on the metabolism of B. polymyxa*

Period	Name of chemical added	Quantity in gm.	Acid formed in gm. eqvts.	Reducing sugar left in gm.	Total sugar left in gm.	Total sugar consumed in gm.	Butanediol	Percentage yield	
								on the basis of sugar added	on the basis of sugar consumed
10 days	—	—	0.0003	4.64	5.68	5.10	1.116	10.5	21.9
	Paraformaldehyde	0.1	alk	2.2	5.06	5.72	—	—	—
	Sodium sulphite	0.1	alk	3.2	4.29	6.49	0.620	5.75	9.5
	Ferric sulphate	0.1	0.0001	3.76	5.29	5.49	0.368	3.4	7.03
	—	—	0.0004	3.85	3.58	7.20	0.461	4.3	6.4
30 days	Paraformaldehyde	0.1	alk	3.03	6.89	3.89	—	—	—
	Sodium sulphite	0.1	0.0004	4.11	4.18	6.60	0.659	6.1	9.98
	Ferric sulphate	0.1	0.0004	4.84	4.85	5.93	1.022	9.48	17.2
	—	—	0.001	4.54	4.28	6.50	2.87	26.6	44.2
	Paraformaldehyde	0.1	alk	3.46	4.84	5.94	—	—	—
50 days	Sodium sulphite	0.1	0.0012	4.2	4.26	6.52	1.54	14.3	23.6
	Ferric sulphate	0.1	0.0012	5.32	4.22	6.66	2.69	24.9	40.8

(Sugar initially present = 10.78 gm. Total volume = 200 c.c.)

quantity of reducing sugar gradually increases with the increase of the period of fermentation.

In the control culture, the consumption of sugar by the organism increases between 10 and 30 days and then it slowly decreases. If paraformaldehyde is present in the culture, the sugar consumption rapidly decreases between 10 and 30 days and then slowly increases with the period of fermentation. The culture containing sulphite or ferric iron does not indicate any appreciable sugar consumption with the increase of the period of fermentation.

The formation of 2.3 butanediol in the culture of *B. polymyxa* indicates a downward trend between 10 and 30 days of fermentation. However, the formation of the glycol increases with the further increase of the period of fermentation. In the cultures containing sulphite or iron the quantity of 2.3 butanediol formed after 10 days is considerably low as compared to the control culture but the formation of the glycol steadily increases with the increase of the period of

fermentation. No 2,3 butanediol is formed in the culture which contained paraformaldehyde though sugar consumption is observed indicating that the organism grows in the culture.

It is interesting to note that though the formation of 2,3 butanediol increases in the control culture and in the cultures containing Fe^{+++} and SO_3 between 30 and 50 days this is not followed by a parallel consumption of sugar during this period.

Summary

In *B. polymyxa* cultures containing sucrose as the substrate the amount of 2,3 butanediol decreases between 10 and 30 days of fermentation but after 30 days, the formation of the glycol increases. If iron or sulphite ions are present in the culture of *B. polymyxa* the yield of 2,3 butanediol is small in the first 10 days, as compared to the control culture but it gradually increases with the increase of the period of fermentation. This increase was observed upto 50 days. In the culture containing paraformaldehyde 2,3 butanediol is not formed. The sugar consumption in the cultures is high only during the first ten days of fermentation and after that though there is enough sugar present, it is not utilised and the amount of 2,3 butanediol goes on increasing. It appears that 2,3 butanediol is formed from some intermediate material formed during the period of high sugar consumption. Later the increase of 2,3 butanediol is due to its formation from the intermediate compound.

References

- HICKY, R. J.: Arch. Biochem. **8**, 439—447 (1945). — HOOREMAN, M.: Ann. Inst. Pasteur **78**, 497—511 (1950). — JARNEFELT, J.: Ann. Acad. Sci. fenn. A., **V**, **57**, 78 (1955). — LEDINGHAM, G. A., G. A. ADAMS and R. Y. STANIER: Con. J. Research, F. **23**, 48 (1945). — MCCALL, K. B., and C. E. GEORGI: Appl. Microbiol. **2**, 355—359 (1954). — MOUREU, H., and M. DODE: Bull. Assoc. Chim. Sucr. dist. **51**, 247—250 (1934). — PAPPENHEIMER, A. M.: J. biol. Chem. **167**, 251—259 (1947). — PAPPENHEIMER, A. M., JR. and E. D. HENDEE: J. biol. Chem. **71**, 701—714 (1947). — PAPPENHEIMER, A. M., and E. SHASKAN: J. biol. Chem. **155**, 265—275 (1944). — UNDERKOFER, L. A., and E. I. FULMER: Wallerstein Labs. Commun. **11** (No. 32), 41 (1948).

(Aus dem Institut für Gartenbau Dresden-Pillnitz der Deutschen Akademie der
Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin)

Beitrag zur Frage der funktionellen Bedeutung der Vesikel der endotrophen Mycorrhiza an Sämlingen von *Malus communis* L.

Von
G. OTTO

Mit 19 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. August 1958)

Die Vesikel der endotrophen Mycorrhiza stellen neben den charakteristisch ausgebildeten Hyphen und Arbuskeln ein prägnantes Merkmal der endotrophen Wurzelverpilzung dar.

Schon in den ersten Arbeiten über das Phänomen der endotrophen Mycorrhiza finden sich Angaben über das Auftreten der Vesikel und Mutmaßungen über deren Bedeutung (Literatur bei KELLEY 1950). Mit dem steigenden Interesse, welches dem Problem der Mycorrhiza nach den Arbeiten von FRANK (1885), SCHLICHT (1888), STAHL (1900) u. a. entgegengebracht wurde, haben sich auch die Angaben über aufgefundene Vesikel gehäuft. Es scheint heute kaum noch eine Pflanzenart zu geben, für deren endotrophe Mycorrhiza nicht auch Vesikel registriert worden sind. Die Vesikel stellen also ein Merkmal dar, welches nicht nur weit verbreitet ist, sondern auch regelmäßig auftritt. Man geht daher sicher nicht fehl in der Annahme, daß den Vesikeln der endotrophen Mycorrhiza im Lebensablauf der Mycorrhizapilze ganz bestimmte Funktionen zukommen müssen. Um so erstaunlicher ist die Feststellung, daß der Ergründung dieser funktionellen Bedeutung der Vesikel im Verhältnis zur gesamten Mycorrhizaforschung so wenig Raum gewidmet worden ist. Im größten Teil diesbezüglicher Veröffentlichungen findet man lediglich Angaben über das Auftreten der Vesikel, deren Form und Größe und mehr oder weniger begründete Vermutungen über ihre Bedeutung. Danach soll es sich entweder um temporäre Speicherorgane, um Dauerorgane der Pilze zur Überwindung ungünstiger Lebensbedingungen, um Infektionsquellen für neu auswachsende Wurzeln (durch Auskeimung der Vesikel mit Hyphen bzw. über die Ausbildung von Außenvesikeln nach SCHRADER 1958¹), um Speicherorgane für die Wirtspflanze (!) oder schließlich um mißglückte Versuche zur Sporenbildung handeln. Nur wenige Autoren, wie z. B. MAGROU (1925), PEYRONEL (1923), VAN DER PIJL (1934) und neuerdings auch SIEVERS (1958), sahen in den Vesikeln, auf Grund vorgefundener besonderer Ausgestaltung, Fortpflanzungsorgane der Pilze bzw. Möglichkeiten für eine Vermehrung auf vegetativem bzw. generativem Wege.

Diesen wenigen Angaben ist leider keine besondere Aufmerksamkeit und kein besonderer Erfolg beschieden gewesen. Der Grund dafür ist sicher in der sehr geringen Zahl entsprechender Beobachtungen zu

¹ Die Korrekturbogen dieser Arbeit wurden mir freundlicherweise zur Einsicht überlassen.

suchen, die oft in nur knapper Form dargestellt wurden (z. B. McLENNAN 1926) und von anderen Autoren nicht bestätigt werden konnten.

Schließt man sich der Meinung an, daß die Vesikel Fortpflanzungsorgane der Mycorrhizapilze darstellen, so kann man zwei Möglichkeiten für eine weitere Klärung dieser Frage als gegeben betrachten: 1. die Reinkultur der endotrophen Mycorrhizapilze mit vergleichender cytologischer Analyse der Fruktifikationsorgane und der Vesikel, 2. die Beobachtung geeigneter Wurzelschnitte und cytologische Analyse der darin enthaltenen Vesikel.

Zweifellos ist jedoch in den Schwierigkeiten, die sich in beiden Fällen einer exakten Untersuchung entgegenstellen, die Ursache für die geringe Zahl entsprechender Arbeiten zu suchen. So ist es bisher nicht gelungen, die endotrophen Mycorrhizapilze auf totem Substrat zu kultivieren. Selbst die aussichtsreichsten Versuche, isolierte Vesikel zum Keimen zu bringen, zeigten nach BERNARD (1911) und BUTLER (1939) keine befriedigenden Ergebnisse. Bei den wenigen, scheinbar geglückten Isolierungen fehlt entweder der exakte Nachweis, daß es sich um die entsprechenden Pilze handelt, oder die Pilze wiesen eine so geringe Wuchskraft auf, daß sie ihr Wachstum bereits nach kurzer Zeit völlig einstellten. So lange es nicht möglich ist, die endotrophen Mycorrhizapilze wuchskräftig in Reinkultur und auf einem entsprechenden Substrat zur Bildung von Vesikeln zu bringen, muß der erstgenannte Weg zur Klärung der Bedeutung der Vesikel zwangsläufig ausscheiden.

Auch in dem zweiten Fall stellen sich Schwierigkeiten ein, welche die Arbeiten zumindest langwierig gestalten. Aus der bereits erwähnten Seltenheit, mit der besonders ausgebildete Vesikel gefunden wurden, war zu schließen, daß das Auffinden entsprechender Stadien in Wurzelschnitten nur bei Durchmusterung eines umfangreichen Materials erfolgversprechend ist. Als weitere Erschwerung kommt hinzu, daß weder über die Abhängigkeit des Auftretens der Vesikel vom Vegetationsablauf noch von ökologischen oder anderen Faktoren eine einheitliche Meinung besteht. Während z. B. SIEVERS (1952) bei *Allium*-Arten ein besonders häufiges Auftreten im Frühjahr feststellt, gibt RIVES (1923) für *Vitis* die Monate August—September an und ARCULARIUS (1928) berichtet über das Auftreten neuer Vesikel bei *Hippophae* im Winter. JONES (1924) u. a. machen schließlich darauf aufmerksam, daß ihre Anzahl in den Wurzeln verschiedener Pflanzenarten und einzelner Pflanzen stark variiert. Lediglich PEYRONEL (1923) macht für derartige Untersuchungen eine wichtige Mitteilung. Er hebt hervor, daß in abgestorbenen Wurzeln von Getreide- und Maispflanzen und wildwachsenden Gräsern Vesikel mit einer besonderen Ausgestaltung ihres Inhaltes in reichlichem Maße zu finden waren. Diese Feststellung führt uns weitere Schwierigkeiten vor Augen, vermag jedoch die geringe Zahl

entsprechender, durch andere Autoren aufgefundener Vesikel zu erklären. So ist es gut vorstellbar, daß durch die erforderliche Behandlung der Wurzeln naturgemäß nur die im verhältnismäßig festen Zellverband stehenden, also meist lebende Wurzeln, zur mikroskopischen Analyse gelangen. Zum Zerfall neigende Wurzeln verbleiben im Boden oder gehen während der Arbeitsprozesse verloren und entziehen sich so der Beobachtung. Es wird darauf noch zurückzukommen sein. Immerhin stellen die diesbezüglichen Angaben PEYRONELS einen wertvollen Hinweis dar.

Material und eigene Beobachtungen

Im Verlauf eigener Untersuchungen über das Auftreten und die Entwicklung der endotrophen Mycorrhiza an Apfelsämlingen wurde eine größere Zahl Mikrotom-Längsschnitte von Sämlingswurzeln untersucht¹. Die Wurzeln wurden nach der Ausgrabung in Wasser ausgewaschen und in einer einprozentigen Formalinlösung ins Laboratorium transportiert. Dort erfolgte die endgültige Fixierung in Kaliumbichromat-Essigsäure nach Tellyesniczky, ROMEIS (1948), die Färbung mit Baumwollblau und die Entwässerung in einer 7stufigen Alkoholentwässerungsreihe. In Übergangsstufen gelangten die Wurzeln dann über Glycerin (zur Erweichung der Wurzeln) und Butanol als Intermedium bis zum Paraffin. Die Untersuchungen erstreckten sich über die jeweils ganze Vegetationszeit bis in den Winter hinein. Dabei konnten Beobachtungen an Vesikeln gemacht werden, die geeignet sind, unsere Kenntnisse über deren funktionelle Bedeutung zu erweitern. Obwohl diese Beobachtungen in bestimmter Hinsicht eine eindeutige und einheitliche Erklärung der funktionellen Bedeutung der Vesikel noch nicht zulassen, scheint bei der relativen Seltenheit entsprechender Beobachtungen eine Veröffentlichung gerechtfertigt zu sein. Sie ist daher als Beitrag zur Diskussion dieser Frage aufzufassen.

1. Merkmale „normaler“ Vesikel

Die eigenen Beobachtungen über die Vesikelbildung und die Morphologie der Vesikel stimmen im allgemeinen mit den in der Literatur gefundenen Angaben überein (vgl. KELLEY 1950). Eine vesikelbildende Hyphe schwillt terminal länglich-blasenförmig an. In dieser Anschwellung sammelt sich, bei zunehmender Volumenvergrößerung, ein feingranuliertes, kernreiches Plasma (Abb.1). Ob die Kerne während der Wanderung zu dem neu gebildeten Vesikel Teilungsprozessen unterliegen, konnte nicht festgestellt werden. Die vesikelbildende Hyphe und der noch junge Vesikel haben in diesem Stadium sehr zarte Zellwände (Abb.1). Erst mit zunehmendem Wachstum der Vesikel wird die Wand

¹ Ein Teil der hier wiedergegebenen Beobachtungen fand in der Dissertation: „Untersuchungen über das Auftreten und die Entwicklung der endotrophen Mycorrhiza an ein- bis dreijährigen Apfelsämlingen auf verschiedenen Standorten“ bereits kurze Erwähnung (Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, 1957. Druck in Vorbereitung). Dieser Arbeit sind auch nähere Angaben über die Fixierung, Färbung und weitere Behandlung der Wurzelpräparate zu entnehmen.

dicker und zeigt das allgemein bekannte Aussehen (Abb. 2). Der Vesikelinhalt weist nun mehr oder weniger grobgranuliertes Plasma und zunehmende Mengen von Fetttropfen auf. In diesem Stadium findet man bei Serienuntersuchungen die meisten Vesikel.

Außer der terminalen Anlage der Vesikel kann auch eine intercalare erfolgen. Diese konnte jedoch nur sehr selten beobachtet werden, wobei

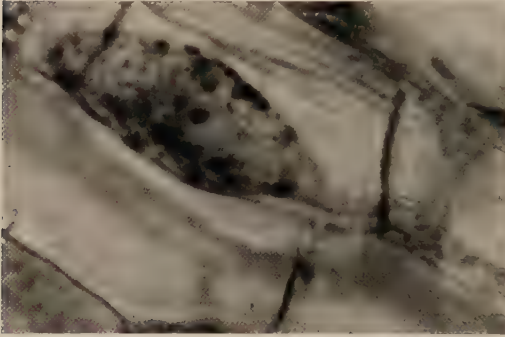


Abb. 1. Erstes Stadium der Vesikelbildung. (Vergr. 1 : 1050)

die intercalaren Vesikel oft kleiner waren als die terminalen des gleichen Objektes. Weiter können die Vesikel inter- und intracellular angelegt werden. Die intercellulare Anlage dominiert bei weitem. Man kann sich den Vorgang etwa so vorstellen: eine zur Vesikelbildung neigende Hyphe wächst in eine Inter-

cellulare und findet dort die geeigneten Bedingungen für eine Volumenvergrößerung. Der zunächst längliche Vesikel (Abb. 1) legt sich den Zellwänden der Wurzelzellen an, die die Intercellulare umgrenzen.

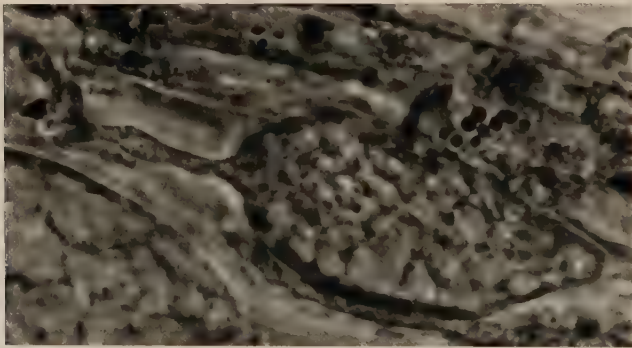


Abb. 2. Terminaler Vesikel mit eingelagerten Fetttropfen. (Vergr. 1 : 600)

Dabei kann er bereits seine länglich- bis rund-ovale Gestalt verlieren und zeigt, der Form der Intercellulare angepaßt, zum Teil eigenartige Konturen. Schwillt er weiter an, so vermag er bei ausreichend hohem Innendruck den Zellverband weiter aufzureißen und so die Intercellulare zu erweitern. Die aufgerissenen Spalten werden durch den nachdrängenden Vesikel ausgefüllt, der dadurch ein vielgestaltiges

Aussehen erhalten kann. Blasen- oder nasenförmige Ausstülpungen an den Vesikeln, Einschnürungen sowie eingeknickte Vesikel sind nicht selten. Vesikelformen, die durch solche Vorgänge entstanden sind und leicht eine spezifische Gestaltung vortäuschen, scheint indessen keine besondere Bedeutung zuzukommen. Die seltener vorkommenden intracellularen Vesikel sind kleiner und meist rund. Erreichen sie die Größe der sie beherbergenden Wurzelzellen, so legen sie sich deren Innenwänden völlig an und zeigen im Schnitt ein der Zellform entsprechendes Bild. Durch intracelluläre Vesikel gesprengte Wurzelzellen wurden in keinem Fall beobachtet.

Aus den geschilderten Merkmalen, die sich auch bei unseren Untersuchungen immer wieder in erstaunlicher Einheitlichkeit darbieten, ließe sich leicht die Schlußfolgerung ziehen, daß die Vesikel tatsächlich nur temporäre Speicherorgane der Pilze darstellen, wie dies von GALLAUD (1905), DEMETER (1923) und anderen behauptet worden ist.

2. Merkmale „besonderer“ Vesikel

Im folgenden sollen unter „besonderen“ Vesikeln jene verstanden werden, die zu Vorstellungen über eine weitergehende funktionelle Bedeutung Veranlassung gegeben haben. Die sinnfälligsten Beobachtungen

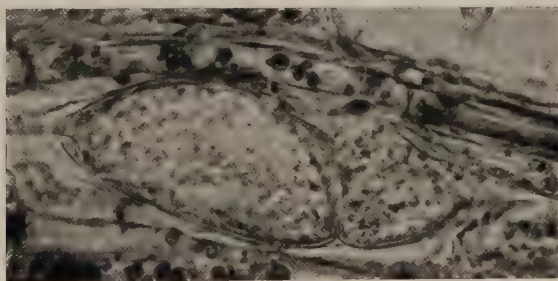


Abb. 3. Zwei terminale, aneinandergelagerte Vesikel. (Vergr. 1 : 420)

dieser Art konnten in Wurzeln mit gehäuft vorkommenden Vesikeln durch deren auffallende Stellungen zueinander gemacht werden. In zahlreichen Fällen fanden sich zwei Vesikel mit den terminalen Enden aneinandergelegt. Ihre Berührungsflächen waren meist mehr oder weniger abgeflacht, eng aneinanderliegend und parallellaufend (Abb. 3). Aneinanderlagerungen von mehr als zwei Vesikeln wurden ebenfalls beobachtet, wobei sich entsprechend der Art der Aneinanderlagerung mehr bzw. größere Berührungsflächen der Vesikel ergaben (Abb. 4). Die Entstehung der Vesikelgruppen kann man sich wie folgt vorstellen: in einer Intercellulare wird ein Vesikel angelegt, der mit zunehmendem Druck auf die umgebenden Zellen diese auseinanderdrängt und die

Intercellulare gewaltsam erweitert. Wächst nun von einer anderen Seite ebenfalls eine zur Vesikelbildung neigende Hyphe in den noch nicht ganz gefüllten Raum dieser vergrößerten Intercellulare ein, so findet sie hier die günstigsten Bedingungen vor. Beide Vesikel wachsen voneinander getrennt weiter, bis sie den zur Verfügung stehenden Raum völlig ausfüllen und zwangsläufig enge Berührungsflächen miteinander bekommen. Ihre Zusammenlagerung kann also rein zufällig sein. Stimmt diese Annahme, so wird in der Regel einer der beiden Vesikel, und zwar der zuerst

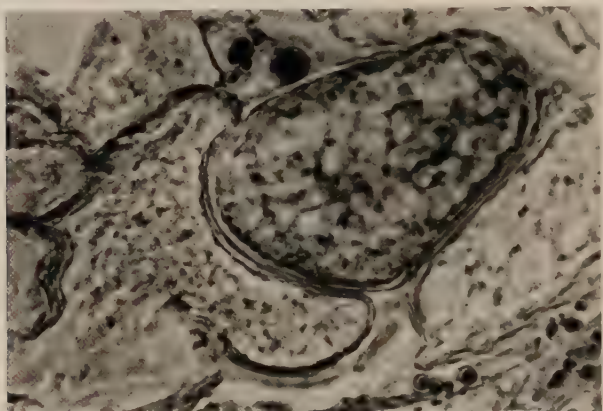


Abb. 4. Ausgedehnte Berührungsflächen zusammengelagerter Vesikel. (Vergr. 1 : 420)

gewachsene, größer sein. Bei den meisten solcher Vesikelfunde konnte das auch bestätigt werden (vgl. Abb. 3).

Eine andere, nur unter Vorbehalten mögliche Erklärung für eine derartige Zusammenlagerung der Vesikel könnte aus Vorgängen abgeleitet werden, wie sie z. B. bei den Oomyceten bzw. Zygomyceten vorkommen (GÄUMANN 1949). In diesem Fall müßte dann jedoch, außer der lokalen Aneinanderlagerung der Vesikel, die nun als männlich bzw. weiblich differenzierte Gametangien aufzufassen wären, das Vorkommen von Befruchtungsschläuchen bzw. eine direkte Verschmelzung der Gametangien erkennbar sein. An den abgebildeten und an zahlreichen ähnlichen Objekten aneinandergelagerter Vesikel konnten jedoch derartige Feststellungen nicht eindeutig gemacht werden. Bis zur Erzielung klarer und aufschlußreicher mikroskopischer Befunde sollte eine Erörterung in diesem Zusammenhang unterbleiben und die Zusammenlagerung der Vesikel als zufällig angesehen werden.

Außer den Schlußfolgerungen, die bei entsprechenden Objekten aus der äußeren Form der Vesikel abzuleiten wären, vermag auch die Gestaltung des Inhaltes der Vesikel Aufschluß über deren funktionelle Bedeutung zu geben. Das während der Vegetationszeit gesammelte

Wurzelmaterial ergab bei der mikroskopischen Analyse für den Vesikelinhalt, wie bereits erwähnt, immer wieder das gleiche Bild. Die Einheitlichkeit dieser Merkmale war so ausgeprägt, daß zunächst auch daraus nur auf eine Funktion als Speicherorgane geschlossen werden konnte. Für kürzere Zeitspannen ungünstiger Bedingungen für die Mycorrhizapilze (z. B. Trockenperioden) wäre eine solche Speicherfunktion denkbar, wobei der Vesikel mit der Hyphe in direkter Verbindung bleibt. Der Vesikel wird zum Nährstoffreservoir. Bei wieder einsetzenden günstigen Bedingungen verläuft der Prozeß rückläufig, und zurück bleibt der entleerte Vesikel. Leere Vesikel wurden bereits von GALLAUD (1905), DEMETER (1923) u. a. beschrieben und konnten auch von uns sehr zahlreich festgestellt werden. Auf der anderen Seite ist es jedoch vorstellbar, daß für das Überleben längerer Zeitspannen ungünstiger Lebensbedingungen (z. B. vegetationslose Zeit) eine offene Verbindung zwischen

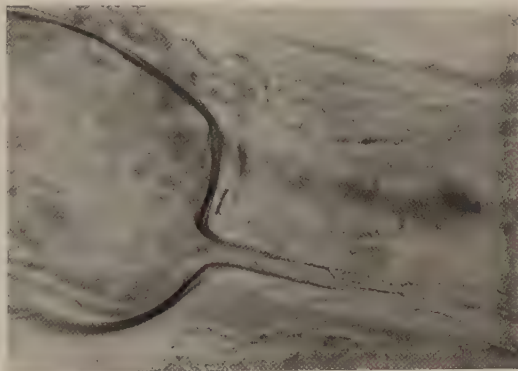


Abb. 5. Plasmaabgrenzung im Hyphenstiel eines Vesikels.
(Vergr. 1 : 925)

der Hyphe und dem Vesikel nicht genügt. Für diesen Fall müßte eine Trennung des Vesikels von der Hyphe mit vorausgehender Abgrenzung des Plasmas erfolgen. Als erster Schritt einer derartigen Plasmaabgrenzung könnte das Auseinanderreißen des Plasmas in den Hyphen in unmittelbarer Nähe der Vesikel angenommen werden (Abb. 5). Nach weiterer Kontraktion des Plasmas erfolgt dann eine Trennung des Vesikels von der Hyphe mit völliger Enzystierung des Vesikels (Abb. 6). Die Vesikel ähneln in diesem Stadium zugeschmolzenen Ampullen. Eine Stützung dieser Vorstellungen ergibt sich aus der Beobachtung, daß „enzystierte“ Vesikel mit Hyphen auszukeimen vermögen. Ähnliche Feststellungen wurden bereits durch GALLAUD (1905), BUSICH (1913) u. a. gemacht. Damit würde die Funktion der Vesikel von einer lediglich speichernden Tätigkeit in eine Funktion von Dauerorganen übergehen, welche dem Pilz nach Zerfall der Wurzel auch die Infektion neuer Wurzeln zu einem späteren Zeitpunkt ermöglicht. Über welche Zeitspanne solche Vesikel keimfähig und damit infektiösfähig bleiben, kann zur Zeit natürlich nicht beantwortet werden. Beide Funktionen müssen aber, trotz mancher Ähnlichkeiten, im

Hinblick auf den Lebensablauf des Pilzes funktionell grundsätzlich voneinander unterschieden werden.

Die funktionelle Bedeutung der Vesikel als temporäre Speicherorgane bzw. als Dauerorgane ist von zahlreichen Mycorrhiza-Forschern immer wieder angenommen worden. Sie bietet jedoch keinerlei Hinweis für eine Vermehrung der Mycorrhizapilze auf vegetativem oder generativem Wege, die für eine Arterhaltung ohne Zweifel erfolgen muß. Da die Einheitlichkeit der Mycorrhizabilder während der ganzen Vegetationszeit keine Aussicht bot, entsprechende Stadien aufzufinden, lag es auf

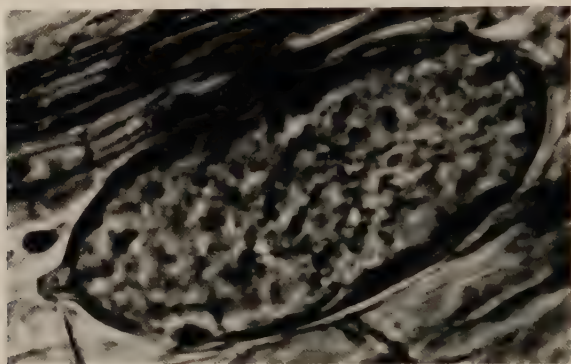


Abb. 6. Ampullenartig verschlossener Vesikel. (Vergr. 1 : 750)

der Hand, diese in der Bodenphase der Pilze bzw. auf dem Weg von der Wurzelphase zur Bodenphase zu suchen. Für diese Untersuchungen wurden Wurzeln herangezogen, deren Entnahme nach Abschluß der Vegetationszeit, d. h. im Winter oder im zeitigen Frühjahr, erfolgt war. Bei diesem Material konnte damit gerechnet werden, daß auch solche Wurzeln zur Untersuchung gelangen, die, wie es für Obstgehölze bekannt ist (KOLESNIKOV 1955), bereits abgestorben sind, aber noch im ursprünglichen Zellverband vorliegen. Für die Mycorrhizapilze bedeutet dieser Wurzelzustand die erste Stufe auf dem Weg von der Wurzel- zur Bodenphase.

Die Richtigkeit dieser Vermutung und der entsprechenden Angaben PEYRONELS (1923) kann durch die vorliegenden Ergebnisse vollauf bestätigt werden. Es sei vorweggenommen, daß alle aufgefundenen Vesikel mit einer besonderen Ausgestaltung ihres Inhaltes fast ausschließlich Wurzeln entstammen, die durch einen mehr oder weniger stark aufgelockerten Zellverband bereits ihren Zerfall zu erkennen gaben. Die Wiedergabe der aufgefundenen Vesikelstadien soll in einer Gruppierung erfolgen, die lediglich zur Erhöhung der Übersichtlichkeit vorgenommen wurde.

a) Vesikel mit besonders kernreichem Inhalt

„Normale“ Vesikel voll intakter Wurzeln weisen außer ihrem zum Teil fettreichen Plasma eine unterschiedliche Zahl von Kernen auf (KELLEY 1950). Diese Kerne sind meist unregelmäßig im Vesikel verteilt und finden sich oft in den Plasmasträngen, die die im Vesikel zu bestimmten Zeiten auftretenden Vacuolen umgrenzen. Zunächst war die unterschiedliche Färbbarkeit dieser Kerne auffallend. Während sie z. B. zur Zeit der Vesikelbildung leicht färbbar erschienen, ließen sie sich bei Vesikeln mit einer sehr großen Zahl von Fetttropfen zum Teil gar nicht erkennen. Obwohl die Wurzelstücke vor der Alkoholentwässerungsreihe mit Baumwollblau gefärbt und dementsprechend durch die weitere Behandlung wieder stark entfärbt wurden, behielten die Kerne in bestimmten Vesikeln ihre tiefblaue Farbe. Deuten diese Beobachtungen bereits auf Aktivitätsphasen der Kerne hin, so kann von Vesikeln mit einer äußerst stark erhöhten Kernzahl nur gefolgert werden, daß außer der Einlagerung eines gegenüber dem Hyphenkern reicheren Plasma auch eine Vermehrung der Kerne innerhalb der Vesikel stattgefunden haben muß (Abb. 7). Trifft diese Vorstellung zu, so muß den Vesikeln, zumindest in einzelnen Fällen, eine Funktion zugesprochen werden, die über die Funktion eines einfachen Dauerorganes hinausgeht. Auf die mögliche Bedeutung kernreicher Vesikel wird noch eingegangen.

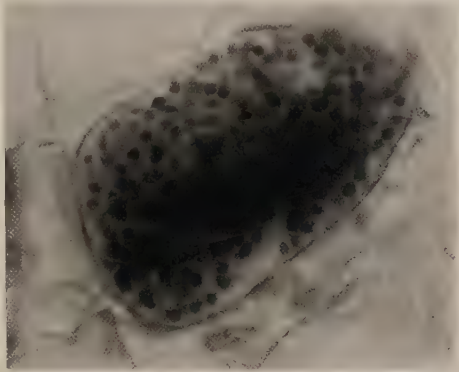


Abb. 7. Vesikel mit stark erhöhter Kernzahl.
(Vergr. 1 : 825)



Abb. 8. Vesikel mit gekammertem Inhalt.
(Vergr. 1 : 600)

b) Vesikel mit gekammertem Inhalt

Wie der Abb. 8 zu entnehmen ist, kann der Inhalt eines Vesikels durch Trennwände in einzelne abgerundete oder auch gegeneinander

abgeflachte, polyedrische Portionen aufgeteilt werden. Obwohl bei diesen Vorgängen äußerst zarte Umhüllungen der einzelnen Plasmaportionen angetroffen wurden, konnten die denkbaren Anfangsstadien dieser Vorgänge, z. B. Furchung oder Zerklüftung des Vesikelplasmas oder

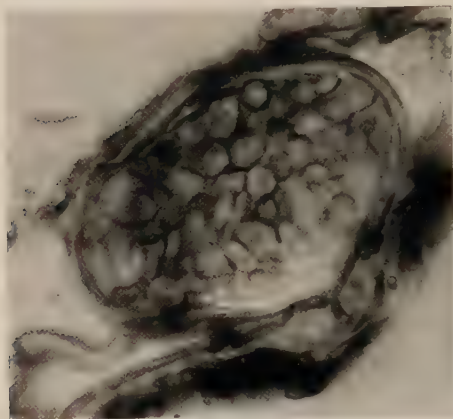


Abb. 9. Fortgeschrittene Kammerung des Vesikelplasmas. (Vergr. 1 : 700)

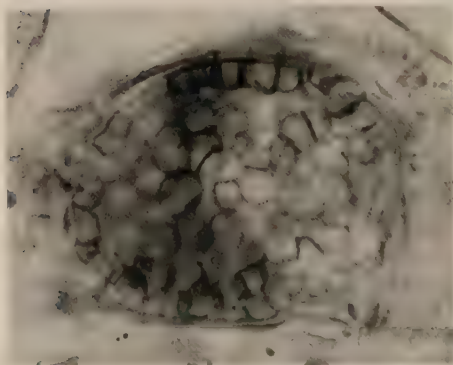


Abb. 10. Vesikel mit endogener Sporenbildung. (Vergr. 1 : 600)

Sammlung des Plasmas um Vesikelkerne, nicht beobachtet werden. Weiter ist der Abb. 8 zu entnehmen, daß die anfangs noch sehr dünnwandigen Vesikel (vgl. Abb. 1 u. 2) während dieser Vorgänge deutlich verdickte Zellmembranen aufweisen. Wie an einigen Objekten beobachtet werden konnte, handelt es sich bei dieser Wandverdickung um eine endogen angelagerte Schicht.

c) Vesikel mit Sporen bzw. Sporenbildung

Nach den dargelegten Beobachtungen stellt sich die Frage nach der Weiterentwicklung dieser gekammerten Vesikel. Vorstellbar wäre, daß die eingetretene Kammerung des Vesikelinhaltes im Sinne einer zunehmenden Verselbstständigung der einzelnen Teile fortschreitet und über eine kräftigere Umwandlung zur Ausbildung von Sporen führt. Dieser Weg wird durch die Abb. 9, 10 u. 11 bestätigt, so daß sich von den ersten be-

obachteten Stadien der Abgrenzung einzelner Plasmaportionen bis zu fertig entwickelten Sporen eine lückenlose Entwicklung verfolgen läßt. Vesikel mit erkennbarer Sporenbildung konnten häufig beobachtet werden, Vesikel mit voll entwickelten Sporen dagegen sehr selten. In einigen Fällen befanden sich die Sporen nicht mehr in den Vesikeln, sondern bereits in dem zerfallenden Wurzelgewebe um die Vesikel verstreut.

Die Sporen sind in der Regel rund-elliptisch, einseitig eingedrückt, erscheinen inhaltlos durchsichtig und gleichen in ihrer Form Eier-

bechern ohne Stiel oder einseitig eingedrückten Gummibällen. Am Rande dieser Einstülpung weisen sie einen Durchmesser von durchschnittlich $12,5\ \mu$ und dazu senkrecht eine Höhe von $7,5\ \mu$ auf. Wie der Abb. 11 zu entnehmen ist, konnten auch Abweichungen von der Becherform der Vesikelsporen beobachtet werden. Da solche Veränderungen der Sporenform jedoch nur in noch ganz geschlossenen Vesikeln gefunden wurden und Sporen außerhalb der Vesikel stets die Becher- bzw. citronenform aufwiesen, kann wohl angenommen werden, daß es sich hierbei nicht um grundsätzlich variable Sporenformen oder um Schrumpfungen handelt, sondern um Formveränderungen, die durch den gegenseitigen Druck der Sporen in den Vesikeln entstanden sind. Man kann sich leicht vorstellen, daß diese Sporen nach dem völligen Zerfall der Vesikelwand und der Wurzeln in den Boden gelangen, mit Hyphen bzw. Sporangien keimen und so wieder in neue Wurzeln eindringen können. Die Keimung der

Sporen konnte vereinzelt in Schnitten von Wurzeln beobachtet werden, deren Rindengewebe fast völlig zerfallen war. Keimende Sporen erschienen länglich-oval mit citronenförmiger Gestalt (Abb. 12, A), einer Länge von $10\text{--}12,5\ \mu$ und einer Breite von $7,5\ \mu$, deren Keimhyphen, mit einem Durchmesser von $2,25\ \mu$, an einer der Spitzen dieser Sporen auftraten (Abb. 12, C). An becherförmigen Sporen konnten jedoch ebenfalls Keimhyphen am Rande ihrer Einstülpung beobachtet werden. Ob es sich bei den citronenförmigen Sporen um eine Quellung der Bechersporen oder lediglich um eine Aufsicht auf die keimenden Bechersporen handelt, konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden.

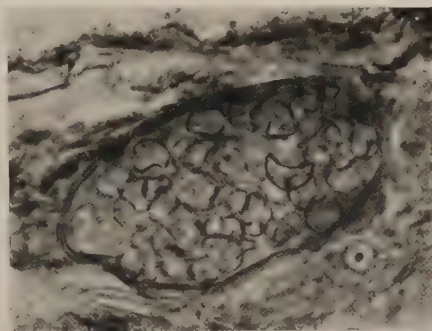


Abb. 11. Vesikel mit becherförmigen Sporen.
(Vergr. 1 : 550)

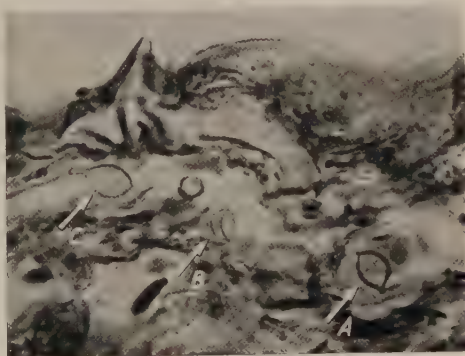


Abb. 12. A citronenförmige, B becherförmige, C keimende citronenförmige Spore.
(Vergr. 1 : 600)

d) *Vesikel als Gametangien*

Die geschilderten Beobachtungen lassen mit einer später noch zu behandelnden Einschränkung klar erkennen, daß die Vesikel zur Sporenbildung befähigt sind und damit auch als zur Fortpflanzung befähigte Organe der Mycorrhizapilze zu betrachten sind. Unbeantwortet bleibt aber die Frage nach der Art der Fortpflanzung. Nach den bisher dargestellten Objekten scheint die Kammerung in den Vesikeln für eine ungeschlechtliche Fortpflanzung zu sprechen. Im Verlauf der Untersuchungen fanden sich jedoch auch Objekte, die zumindest Anhaltspunkte für die Fähigkeit der Vesikel zur geschlechtlichen Fortpflanzung liefern.

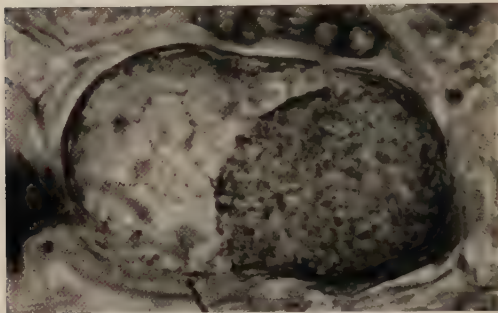


Abb.13. Vesikel mit differenziertem Plasma. (Vergr. 1 : 625)

So ist in Abb.13 ein Vesikel wiedergegeben, der auf einer Seite einen Inhalt aufweist, wie er in den meisten anderen Vesikeln vorgefunden wird. In seiner anderen Hälfte hat sich aber kreisförmig um einen dunk-

leren, zentralen Punkt (in der Abbildung schlecht erkennbar) ein feingranuliertes Plasma ausgebildet. Dieses feingranulierte Plasma schmiegt sich außerdem als dünner Streifen (in der Abbildung ebenfalls nur schwach erkennbar) der Innenwand des Vesikels an. Es liegt nahe, diesen Vorgang z. B. mit der Ausbildung einer Oosphäre in Verbindung zu bringen. Das würde bedeuten, daß sich manche Vesikel als weiblich differenzierte Gametangien darstellen können, und daß demnach auch ein Befruchtungsvorgang und männlich differenzierte Vesikel bzw. Antheridien zu erwarten sind. Schon Abb.13 gibt hierfür einen Hinweis. Die schmale Auflagerung an der äußeren Vesikelwand an der Seite, von der die Plasmaumgestaltung ausgeht, könnte den Ansatz eines Antheridiums oder ein kollabiertes Antheridium darstellen. Ein weiterer Hinweis dieser Art findet sich in der Abb.14. Hier endet an einem Vesikel, dessen Inhalt sich in der beschriebenen Weise aufzuspalten beginnt, eine starke Hyphe (Antheridium?), die in ihrer terminalen Erweiterung direkt an der Vesikelwand deutlich zwei Kerne aufweist. Interessant war bei diesen Objekten die Beobachtung, daß auf der Seite der Berührung zwischen den vermutlichen Antheridien mit den vermutlich weiblich differenzierten Vesikeln immer auch der offensichtliche Ausgangspunkt der Umgestaltung des Plasmas zu finden war. Leider ist es in keinem Fall gelungen, die Herkunft dieser vermutlichen Antheridien

aufzufinden. Lediglich Abb.15 vermag einen Hinweis zu geben. Einer der beiden nahe beieinander liegenden Vesikel wächst mit einer an der Spitze angeschwollenen Hyphe auf den anderen Vesikel zu, der bei intensiv gefärbtem, feingranuliertem Plasma eine kreisförmige Vacuole aufweist. Möglicherweise haben wir es hier mit geschlechtlich verschiedenen

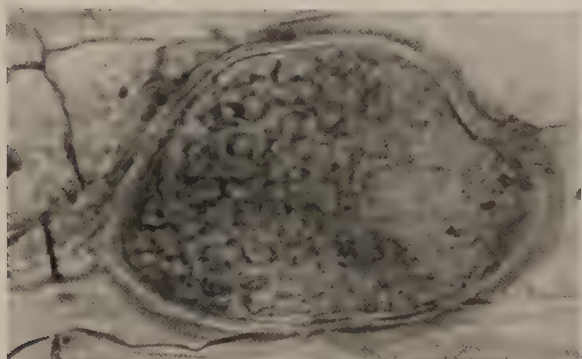


Abb.14. Vesikel mit gekammertem Inhalt; links, an den Vesikel angelegt, befindet sich eine terminal erweiterte Hyphe mit 2 Kernen. (Vergr. 1 : 825)

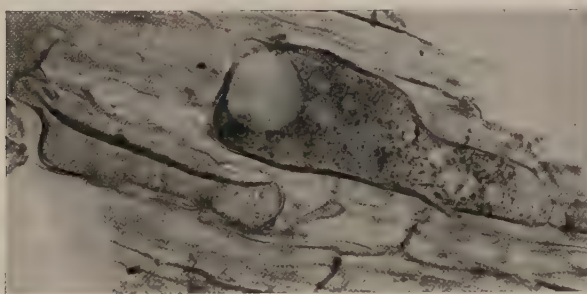


Abb.15. Vesikel mit feingranuliertem Plasma und Vacuole; daneben mit terminal erweiterter Hyphe auskeimender Vesikel. (Vergr. 1 : 450)

differenzierten Vesikeln zu tun, deren Kopulation durch einen hyphenartigen Auswuchs des einen Vesikels erfolgen soll.

Außer in den Abb.13, 14 u. 15 finden wir auch in den Abb.16 u. 17 einen weiteren Hinweis für eine mögliche geschlechtliche Differenzierung der Vesikel. Abb.16 zeigt einen der Größe und Form nach normalen Vesikel, in dessen Plasma Kerne als dunkle Punkte erkennbar sind. Daneben, dicht an die Vesikelwand angeschmiegt, befindet sich eine in spiraliger Windung an den Vesikel herangewachsene, terminal stark erweiterte Hyphe, in deren Erweiterung wieder zwei Kerne erkennbar sind. Diese Kerne und die des Vesikels sind gut angefärbt, etwas vergrößert und weisen nicht scharf abgegrenzte Konturen auf. Abb.17 stellt

dasselbe Objekt in einer anderen Ebene dar. Hier kann man zwischen dem Vesikel und der Erweiterung der Hyphe einen Porus feststellen, der durch eine Verschmelzung der Membranen entstanden sein muß. Die Plasmen sind jedoch voneinander getrennt und lassen noch keine

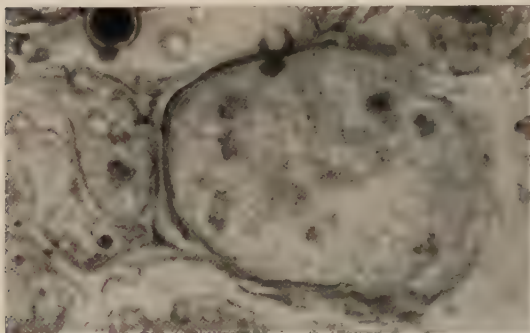


Abb. 16. Vesikel mit seitlich angelegter, terminal erweiterter Hyphe. (Vergr. 1 : 900)

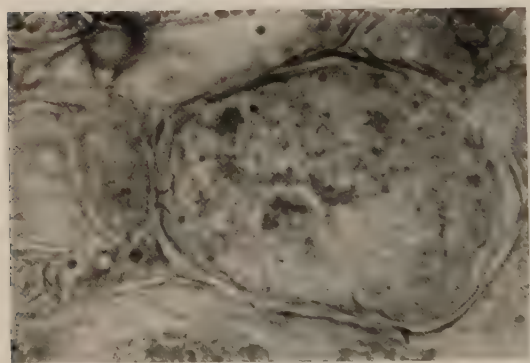


Abb. 17. Porus zwischen Vesikel und erweiterter Hyphe der Abb. 16. (Vergr. 1 : 900)

Anzeichen für die Ausbildung eines Befruchtungsschlauches bzw. einer Plasmaverschmelzung erkennen. Der Kopulationsvorgang selbst konnte in keinem Fall eindeutig festgestellt werden. Lediglich Abb. 18 zeigt ein Objekt, bei dem es sich möglicherweise um einen Befruchtungsschlauch während der Durchwachsung durch das Periplasma eines weiblich differenzierten Vesikels handelt.

Nach den hier vorliegenden Beobachtungen, die nur eine Auswahl aus einer größeren Anzahl ähnlicher Beobachtungen darstellen, kann abschließend angenommen werden, daß wir in den Vesikeln der endotrophen Mycor-

rhiza bei Apfelsämlingen nicht nur Speicher- und Dauerorgane, sondern grundsätzlich auch Vermehrungsorgane der entsprechenden Pilze zu sehen haben. Dagegen kann die Frage nach der Fähigkeit der Vesikel zur geschlechtlichen oder ungeschlechtlichen Vermehrung noch nicht eindeutig beantwortet werden. Obwohl sich für beide Möglichkeiten Hinweise ergeben, wird eine endgültige Klärung weiteren Beobachtungen vorbehalten bleiben müssen. In diesem Zusammenhang sei auf eine Feststellung hingewiesen, die eine weitere Erklärung für die Seltenheit entsprechender Beobachtungen geben kann.

Wie schon erwähnt, hat PEYRONEL (1923) festgestellt, daß Vesikel mit solchen besonderen Funktionen vorwiegend in abgestorbenen Wurzeln

zu finden sind. In Übereinstimmung damit gehen auch die eigenen Beobachtungen fast ausschließlich auf Wurzeln zurück, die keinen festen, lebenden Zellverband mehr aufwiesen. Allerdings stellen „abgestorbene“ Wurzeln nicht die einzige Bedingung für das Auffinden solcher Vesikelstadien dar. So konnten z. B. bei Untersuchungen von Wurzeln mehrerer Sämlinge eines Standortes und eines dafür günstigen Ausgrabungstermines in den Wurzeln fast aller Sämlinge nur „normale“ Vesikel gefunden werden. In den Wurzeln einzelner Sämlinge dagegen fanden sich besondere Vesikelstadien in gehäuftem Maße. Das läßt darauf schließen, daß zur Einleitung solcher Vorgänge in den Vesikeln ein ganz bestimmter Zustand des Gewebezerfalls bzw. ein bestimmter physiologischer Zustand der Wurzeln vorhanden sein

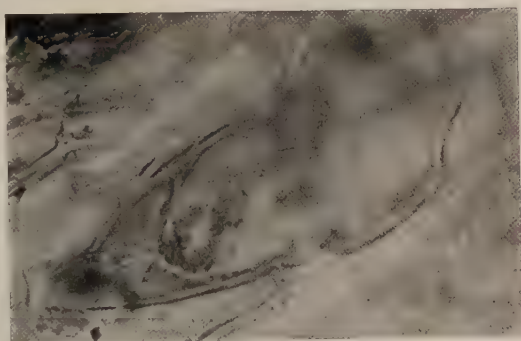


Abb. 18. Vesikel, möglicherweise mit Befruchtungsschlauch und Periplasma. (Vergr. 1 : 500)

muß. Dieser tritt bei Wurzeln vergleichbarer Sämlinge nicht zum gleichen Zeitpunkt ein. Möglicherweise kommt hier den osmotischen Veränderungen um die Vesikel während des Wurzelzerfalles eine besondere Bedeutung zu. In dieser Beobachtung bestätigt sich die eingangs gemachte Vermutung, daß das Finden aufschlußreicher Vesikelstadien an die Durchmusterung eines sehr umfangreichen Materials gebunden ist.

Diskussion

Durch die vorliegenden Beobachtungen kann auch für Apfelsämlinge die Auffassung von PEYRONEL (1923) bestätigt werden, der die Vesikel der endotrophen Mycorrhiza an Gramineen und beim Mais als sporenbildende Organe beschrieb und abbildete. Handelt es sich bei den Vesikeln also um Fruktifikationsorgane, so muß bei der Erörterung dieser Frage die systematische Stellung der Mycorrhizapilze Berücksichtigung finden. Die systematische Stellung der Endophyten ist jedoch nach wie vor ein ungelöstes Problem. Es sei hier darauf hingewiesen, daß die sehr unterschiedlichen Ergebnisse in der Mycorrhizaforschung eine einheitliche Erklärung ihrer Bedeutung für die Pflanzen bisher nicht zulassen. Wie RAMSBOTTOM (zit. bei HARLEY 1949) feststellt, erfordert jedes Objekt ein gesondertes Studium. Diese Forderung dürfte in ganz

besonderem Maße für die Frage der systematischen Stellung der Mycorrhizapilze und damit auch für die funktionelle Bedeutung der Vesikel zutreffen. Wenn hier trotzdem ein Vergleich der eigenen Beobachtungen mit denen anderer Autoren an anderen Pflanzenarten unternommen wird, so nur aus Mangel an entsprechenden Angaben über die Endophyten von Obstgehölzen und unter dem Vorbehalt, daß es sich um nicht identische Pilze und um nicht vergleichbare Bedingungen handeln kann.

PEYRONEL (1923) läßt die Frage nach der systematischen Stellung der von ihm untersuchten Endophyten offen, vermutet jedoch, daß sie mit großer Wahrscheinlichkeit der Gattung *Endogone* zuzuordnen sind. Dieser Meinung haben sich neben BUTLER (1939) auch MOSSE (1956) und NICOLSON (1958) angeschlossen. MOSSES Schlußfolgerungen beruhen jedoch auf Impfversuchen mit *Endogone*-Fruchtkörpern bzw. auf der Beobachtung direkter Hyphenverbindungen zwischen diesen und Erdbeerwurzeln. Ebenso fand NICOLSON direkte Verbindungen zwischen *Endogone*-ähnlichen Fruchtkörpern und dem endophytischen Mycel in den Wurzeln von *Festuca rubra* var. *arenaria* und *Ammophila arenaria*. Vergleicht man die hier wiedergegebenen Beobachtungen mit den Angaben von PEYRONEL (1923) und BUTLER (1939) sowie mit den von BUCHOLTZ (1912), THAXTER (1922) und WALKER (1923) angegebenen Merkmalen für *Endogone*, so ergibt sich teilweise eine gute Übereinstimmung. Danach würden die von uns beobachteten Vesikel den Sporangien entsprechen, wie sie von BUCHOLTZ (1912) für die Art *Endogone pisiiformis* Link beschrieben werden, die bei THAXTER (1922) jedoch unter *Endogone malleola* Harkn. zu finden ist. Nun besteht aber durch das Fehlen einer deutlich ausgeprägten Membran zwischen dem Vesikel und der Hyphe ein grundsätzlicher Einwand gegen die Vorstellung, daß es sich bei den Vesikeln um reproduktive Organe handelt. Die Angaben in der entsprechenden Literatur sind sehr unterschiedlich. In den eigenen Untersuchungen konnte der Nachweis einer derartigen Membran nicht erbracht werden. Es wäre jedoch zu erwägen, ob andere „Verschlußarten“ die Funktion dieser Membran übernehmen können. Hier sei an die Plasmaabgrenzung im Hyphenstiel der Vesikel erinnert (Abb. 5), sowie an den ampullenartigen Verschluß der Vesikel (Abb. 6) oder an die Ausbildung besonders starker Vesikelwände. Diese könnten, entsprechend den Chlamydosporen bei *Endogone*, durch ihre Fortsetzung bis in den Hyphenstiel ebenfalls zu einer Trennung der Plasmen führen. Darüber hinaus sollen nach BUCHOLTZ (1912) die Sporangien von *Endogone* lange Zeit mit ihrem Hyphenstiel in offener Verbindung bleiben oder manchmal durch ein dichteres Plasma pfropfenartig verschlossen werden. Schließlich sei in diesem Zusammenhang auf die Angaben von BUCHOLTZ (1912) hingewiesen, wonach der obere Stiel

der Sporangien ebenfalls an der Sporenbildung teilnehmen kann. Diese Beobachtung konnte auch für die Vesikel bestätigt werden (Abb.19).

Die Bildung der Sporen in den Vesikeln stimmt mit der von BUCHOLTZ (1912) beschriebenen Bildung der Sporangiosporen bei *Endogone* gut überein. Dagegen zeigt ein Vergleich der von PEYRONEL (1923) und der von uns gefundenen Sporen gewisse Unterschiede. Nach PEYRONEL (1923) sind die Sporen elliptisch, citronenförmig, glasdurchsichtig oder granuliert, von konstanter Form und Größe. Becherförmige Sporen werden von PEYRONEL (1923) nicht erwähnt. Es kann nur angenommen

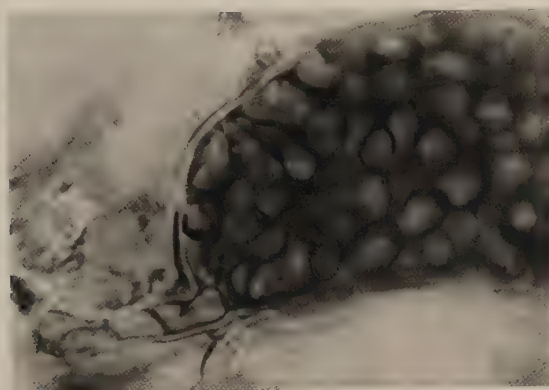


Abb.19. Vesikel mit Sporenbildung auch im Hyphenstiel. (Vergr. 1 : 800)

werden, daß er entweder diese Sporenform in seinen Objekten nicht gefunden hat oder daß es sich bei den von ihm untersuchten Endophyten um eine andere Pilzart gehandelt hat. Letzteres würde auch eine Erklärung für die etwas größeren citronenförmigen Sporen ($17-24\mu \times 9-15\mu$) darstellen. Allerdings muß hier eine Angabe von WALKER (1923) berücksichtigt werden, wonach die Sporengröße bei *Endogone malleola* je nach dem Typ der Sporangien sehr unterschiedlich sein kann.

Die Beobachtungen, die auf eine geschlechtliche Differenzierung der Vesikel hindeuten, lassen zunächst keine Beziehung zu den entsprechenden Vorgängen bei *Endogone* erkennen. Weder die Zygosporienbildung noch der typische Kopulationsvorgang konnten an unserem Material beobachtet werden. Die Abb.13—18 lassen vielmehr eine Ähnlichkeit mit solchen Vorgängen bei den Oomyceten vermuten. VAN DER PIJL (1934) hat bereits die Endophyten von *Burmanna candida* zu den Oomyceten gestellt, doch ist ihm und anderen Autoren der eindeutige Nachweis anscheinend nicht geglückt. Da auch wir in keinem Fall die Differenzierung des Vesikelplasmas in ein echtes Oo- und Periplasma,

das eindeutige Auftreten von Befruchtungsschläuchen und die Ausbildung von Oosporen finden konnten, dürfte eine Erörterung dieser Frage wenig Erfolg versprechen.

Eine rein hypothetische Vorstellung über die scheinbare Fähigkeit der Vesikel zur geschlechtlichen und ungeschlechtlichen Vermehrung sei jedoch noch angefügt. Unterstellen wir zunächst, daß die Endophyten der Gattung *Endogone* angehören, so hätte die Befruchtung in Form einer Kopulation der Gametangien zu erfolgen, wie dies von BUCHOLTZ (1912) beschrieben worden ist. Innerhalb des lebenden Wurzelgewebes könnten jedoch für derartige Vorgänge ungünstige Bedingungen herrschen, so daß der Pilz die hierfür bestimmten Elemente zunächst in einem Vesikel (Dauerspore) deponiert. So geschützt, wird das Absterben und der Zerfall der Wurzel abgewartet. Durch eine hyphenartige Verbindung zwischen geschlechtlich verschieden differenzierten Vesikeln (vgl. Abb. 15) könnten nun z. B. die zur Befruchtung privilegierten Kerne eines besonders kernreichen Vesikels (vgl. Abb. 7) an einen weiblich differenzierten Vesikel herangebracht werden (vgl. Abb. 14, 16). Bleibt diese Verbindung aus, so können sich die Vesikel entweder zu Sporangien oder Azygosporen entwickeln oder wieder mit Hyphen auskeimen. Mit dieser Hypothese läßt sich die Ansicht von WALKER (1923) vereinbaren, die in den Chlamydosporen, Sporangien und Zygo-sporen von *Endogone* nur verschiedene Stadien eines Pilzes vermutet. Auch BUCHOLTZ (1912) erwägt die Möglichkeit, daß die *Endogone*-Arten, von denen jeweils nur eine reproduktive Form bekannt ist (Sporangium oder Zygospora), in Wirklichkeit nur die geschlechtliche und ungeschlechtliche Vermehrungsform einer Art darstellen. Schließlich würden die Endophyten, entsprechend den Angaben von BUCHOLTZ (1912) für *Endogone*, dadurch eine deutliche Stellung zwischen den Oomyceten und Zygomyceten einnehmen. Neben dieser Vorstellung muß aber auch die Möglichkeit erwähnt werden, daß an der Mycorrhiza einer Pflanze verschiedene Pilzarten beteiligt sein können. HAWKER u. HAM (1957) haben erneut auf diese Möglichkeit hingewiesen. In diesem Fall wären die von uns beobachteten Stadien der Vesikel jeweils verschiedenen Pilzarten zuzuordnen. Erst weitere Arbeiten werden hier eine Klärung bringen können.

Ein Einwand gegen die Sporenbildung in den Vesikeln soll hier noch Erwähnung finden. PEYRONEL (1923) hat darauf hingewiesen, daß die sporenbildenden Vesikel vorwiegend in abgestorbenen Wurzeln zu finden sind und demnach einer erhöhten Infektionsgefahr durch andere bodenbewohnende Pilze ausgesetzt sind. Nach seiner Meinung könnte es sich um *Chytridiaceae* handeln, die in die Vesikel eindringen, um dort zu fruktifizieren, und so Vesikelsporen vortäuschen. In den verhältnismäßig zahlreich aufgefundenen Vesikeln konnten jedoch eindeutige

Beobachtungen dieser Art nicht gemacht werden. Nur in ganz vereinzelten Fällen wurden in Vesikeln Hyphen vorgefunden, die als Fremdinfectionen erkennbar waren. Obwohl kaum Bedenken gegen eine Deutung unserer Beobachtungen als vesikeleigene Vorgänge bestehen, sollte dieser Frage weiterhin Beachtung geschenkt werden.

Zusammenfassung

An zahlreichen Längsschnitten von Sämlingswurzeln von *Malus communis* L. konnten Beobachtungen gemacht werden, die geeignet sind, die Kenntnisse über die funktionelle Bedeutung der Vesikel endotropher Mycorrhizen zu erweitern.

1. In Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur wird die Bildung und Morphologie der Vesikel beschrieben.

2. Die Form der Vesikel wird weitgehend von dem sie umgebenden Wurzelgewebe bestimmt; ihr Inhalt weist normalerweise fein- oder grobgranuliertes Plasma mit zahlreich eingelagerten Fetttropfen auf.

3. Neben der bekannten Ausgestaltung des Vesikelplasmas weisen besonders kernreiche sowie gekammerte Vesikel auf ihre Funktion als Fruktifikationsorgane hin.

4. Der Nachweis konnte durch das Auffinden verschiedener Sporenbildungsstadien sowie becherförmiger Sporen in den Vesikeln erbracht werden.

5. Besondere Differenzierungen des Vesikelplasmas und vermutliche Beziehungen zwischen eng an die Vesikel angelegte, terminal erweiterte Hyphen deuten eine mögliche Funktion der Vesikel als geschlechtliche Vermehrungsorgane an. Da hierfür ein eindeutiger Nachweis nicht erbracht werden konnte, muß die Frage nach der Fähigkeit der Vesikel zur geschlechtlichen oder ungeschlechtlichen Vermehrung vorerst unbeantwortet bleiben.

6. Die systematische Stellung der Mycorrhizapilze wird auf Grund der beobachteten Vesikel diskutiert. Obwohl verschiedene Merkmale für eine Zugehörigkeit der Endophyten zur Gattung *Endogone* sprechen, kann auch hier ein endgültiges Urteil nicht abgegeben werden.

Literatur

- ARCULARIUS, J. J.: Zbl. Bakt. II. Abt. **74**, 191—207 (1928).
 BERNARD, N.: Ann. d. Sci. nat., Bot., Sér. 9, **11**, 235—258 (1911). — BUCHOLTZ, F.: Beih. bot. Zbl. **29** (2), 147—224 (1912). — BUSICH, E.: Verhandl. d. Zool.-Bot. Ges. i. Wien **63**, 240—264 (1913). — BUTLER, E. J.: Trans. Brit. Mycol. Soc. **12**, 274—301 (1939).
 DEMETER, K.: Flora (Jena) **116**, 405—456 (1923).
 FRANK, A. B.: Ber. deutsch. bot. Ges. **3**, 128—145 (1885).
 GALLAUD, G.: Rev. gén. d. Bot. **17**, 5—48, et seq. (1905). — GÄUMANN, E.: Die Pilze. Basel: Birkhäuser 1949.

HAWKER, L. E., and A. M. HAM: *Nature* (Lond.) **180**, 998—999 (1957).

JONES, F. R.: *J. Agr. Res.* **29**, 459—470 (1924).

KELLEY, A. P.: *Mycotrophy in Plants*, Waltham, Mass., USA (1950). — KOLESNIKOV, V. A.: *Rep. 14th int. horticult. Congr.* **1**, 906—913 (1955).

MAGROU, J.: *Ann. d. Sci. nat., Bot.*, 10 me sér. **7**, 725—780 (1925), zit. b. KELLEY (1950). — MCLENNAN, E. J.: *Annals of Botany* **40**, 43 (1926). — MOSSE, B.: *Annals of Botany*, N. Ser. **20**, 349—362 (1956).

NICOLSON, T. H.: *Nature* (Lond.) **181**, 718—719 (1958).

PEYRONEL, B.: *Bull. d. l. Soc. Mycol. d. France* **39**, 119—126 (1923). — PIJL, L. VAN DER: *Recueil d. trav. bot. néerlandais* **31**, 761—779 (1934).

RAMSBOTTOM, J.: zit. b. HARLEY, *Nature* (Lond.) **164**, 1041—1042 (1949). —

RIVES, L.: *Rev. Vitic.* **59**, 385—392, 405—409 (1923), zit. b. KELLEY (1950). —

ROMEIS, B.: *Mikroskopische Technik*. München 1948.

SCHLICHT, A.: *Ber. deutsch. bot. Ges.* **6**, 269—272 (1888). — SCHRADER, R.: *Arch. Mikrobiol.* **32**, 81 (1958/59). — SIEVERS, E.: *Arch. Mikrobiol.* **18**, 289—321 (1952); **29**, 101—107 (1958). — STAHL, E.: *Jb. wiss. Bot.* **34**, 539—668 (1900).

THAXTER, R.: *Proc. Amer. Acad. Arts Sci.* **57**, 291—350 (1922).

WALKER, L. B.: *Mycologia* (N. Y.) **15**, 245 (1923).

(Aus dem Institut für technische Hygiene und Mikrobiologie, Technische Hochschule Dresden, und dem Hygiene-Institut der Medizinischen Akademie Dresden „Carl Gustav Carus“)

Über die antagonistische Wirkung aerober Sporenbildner gegenüber pathogenen Hautpilzen

Von

RENATE BLASCHKE-HELLMESSEN

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. November 1958)

Das Beieinanderleben verschiedenartiger Mikroben in einem gemeinsamen Lebensraum und ihre Wechselbeziehungen, seien sie wachstumsfördernder oder -hemmender Natur, haben die mikrobiologische Forschung in den letzten Jahrzehnten besonders beschäftigt. Die Untersuchungen letztgenannter Art fanden ihre Krönung in der Auffindung antimikrobiell wirkender Substanzen — den Antibiotica —, die in der Bekämpfung von Infektionskrankheiten bereits Hervorragendes geleistet haben. Das unter dem Einfluß der antibiotischen Therapie sich entwickelnde und häufig bearbeitete Phänomen der Resistenz einiger Mikroben gegenüber den antibiotischen Medikamenten gab Veranlassung, die Suche nach neuen Präparaten allorts fortzusetzen.

Eine andersartige Situation ergibt sich demgegenüber für das Gebiet der medizinischen Mycologie. Noch immer besitzt nämlich der Kliniker kein Mittel der Wahl, das die oft sehr hartnäckigen Mycosen wirksam und rasch zu heilen vermag. Die Behandlung von Pilzinfektionen muß sich heute vor allem auf die Chemotherapie stützen, da sich die therapeutisch wichtigsten Vertreter der Antibiotica bisher gegen die menschlichen Mycosen als unwirksam erwiesen haben, mit Ausnahme des Penicillins, das sich bei der Behandlung der Actinomycose bewährt hat. Dieser Tatbestand hat in Anbetracht der allgemein beobachteten zunehmenden Verbreitung der Mycosen der regen Suche nach neuen fungiciden und fungistatischen Antibiotica, in der Hoffnung, eines Tages ein wirksames Antimycoticum finden zu können, starke Impulse gegeben.

In erster Linie wurden bisher Actinomycceten aus dem Erdboden isoliert und auf ihre antimycotische Aktivität gegenüber pathogenen Hautpilzen untersucht (SCHATZ u. HAZEN 1948, URI 1957, WOZNICKA u. a. 1957). SCHATZ u. HAZEN fanden 51% von den 243 von ihnen aus dem Erdboden isolierten Actinomycceten gegen pathogene Pilze wirksam. Der Prozentsatz der antimycotisch wirksamen Erdbakterien lag beträchtlich niedriger, während derjenige der Erdpilze in dieser Hinsicht eine Mittelstellung einnahm.

Eine Beobachtung, die sich auf eine zufällige Verunreinigung einer Hautpilzkultur mit einem aeroben Sporenbildner gründete, gab Veranlassung, dem Antagonismus zwischen pathogenen Hautpilzen und

Bakterien näher nachzugehen. Auf der genannten Kultur zeigte sich nämlich eine starke Hemmung des normalen Wachstums der Pilzkolonie, die aller Wahrscheinlichkeit nach durch Stoffe ausgelöst war, die von der Kolonie eines Sporenbildners, der die Bezeichnung *Bacillus subtilis*, erhielt, in den Agarnährboden diffundiert waren (siehe Abb. 1). Durch diese Beobachtung angeregt wurde der Frage nachgegangen, welche Bedeutung den Bakterien, insbesondere den aeroben Sporenbildnern, für den mikrobiellen Antagonismus gegenüber pathogenen Hautpilzen zukommt.

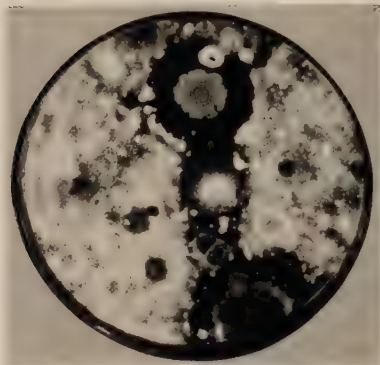


Abb. 1. Eine durch Mikroben der Luft verunreinigte Hautpilzkultur (*Trichophyton mentagrophytes*). Oben: antimycotisch wirksamer aerober Sporenbildner. Unten: antimycotisch wirksamer Schimmelpilz

Das Schrifttum über diese Frage reicht etwa bis zum Jahre 1928 zurück, in dem CHAMBERS u. WEIDMAN wohl erstmals über die antimycotische Wirkung von *Bacillus subtilis*-Stämmen berichteten, die sie aus Interdigitalräumen gesunder Menschen isoliert hatten. 1942 beschrieb KATZNELSON einen thermostabilen, diffusen Stoff eines aeroben Sporenbildners, der das Wachstum von 71 der 81 geprüften parasitischen und saprophytischen Pilze hemmte. LEWIS u. Mitarb. (1946) fanden durch eine sekundäre Infektion einer Hautpilzkultur einen Stamm *Bacillus subtilis*, dessen Kulturfiltrate pathogene Pilze und einige Bakterienarten am Wachstum hinderten.

Seit der Entdeckung des Tyrothricins 1939 (DUBOS u. CATTANEO), des Subtilins 1944 (JANSEN u. HIRSCHMANN), des Bacillomycins 1948 (LANDY u. a.) und des Mycobacillins 1955 (MAJUMDAR u. BOSE) gibt es antimycotisch wirksame Präparate, die aus aeroben Sporenbildnern oder ihren Kulturmedien gewonnen werden. Die klinische Anwendung dieser Präparate erfährt allerdings durch die ihnen eigene hohe Toxizität und ihre geringe in vivo-Aktivität eine zum Teil recht erhebliche Einschränkung.

Experimenteller Teil

I. Der Anteil antimycotisch wirkender aerober Sporenbildner in der Luft und im Erdboden

A. Methodik

Gewöhnliche Agarplatten wurden an verschiedenen Orten im Labor und im Freien der Luft exponiert oder mit Erdpartikeln bestreut und anschließend 24 Std bei 37° C bebrütet. Von diesen Platten wurden wahllos 200 Bacillenstämmen isoliert. Die Artzugehörigkeit wurde nach BERGEYS Manual für die Sporenbildner ermittelt, die sich bei den weiteren Untersuchungen als besonders stark antimycotisch wirksam erwiesen.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden ausschließlich frisch aus Patientenmaterial isolierte pathogene Hautpilze verwandt, die keinerlei pleomorphe Entartung zeigten und auch gut sporulierten. Das als Teststamm verwendete *Tricho-*

phyton rubrum sowie *Trichophyton mentagrophytes* stammten aus einer Interdigitalmykose, *Microsporum canis* aus einer Oberarmläsion.

Zur Feststellung der antimycotischen Wirkung der Bacillen wurde folgende Testmethode herangezogen: Ein Dextroseagar nach SABOURAUD (2% Dextrose; 1% Mykopepton A; 2,5% Agar und aqua dest.; pH 5,8—6,0) wurde mit einer Conidienaufschwemmung des jeweilig auf seine Empfindlichkeit gegenüber den Stoffwechselprodukten der Bacillen zu testenden Hauptpilzstamms infiziert. Die Anzahl der Conidien wurde so bemessen, daß nach 10-tägiger Bebrütung bei 22° C ein einheitlicher Pilzrasen auf den Plattenkulturen gewachsen war. Bei *Tr. mentagrophytes*

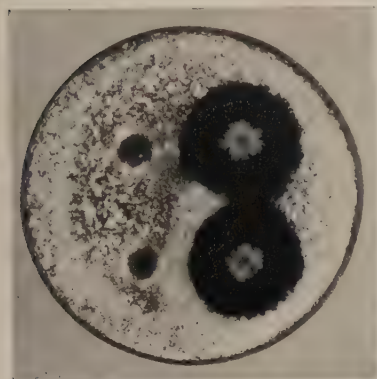


Abb. 2. Pilzrasen von *Trichophyton mentagrophytes* mit Kolonien aerober Sporenbildner — verschieden große Höfe totaler Wachstumshemmung

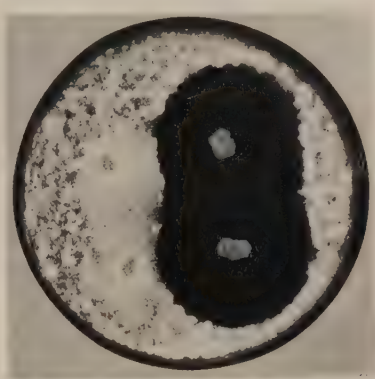


Abb. 3. Pilzrasen von *Epidermophyton floccosum* mit Kolonien aerober Sporenbildner — rechts großer Hof totaler Wachstumshemmung, links Förderung der Luftmycelbildung

sowie *Tr. rubrum* betrug die Anzahl der Mikroconidien bzw. bei *M. canis* die Anzahl der Makroconidien annähernd 5000 je ml Nähragar. Auf die Oberfläche dieses mit Pilzsporen versehenen und in Petrischalen ausgegossenen Agars wurden nun die auf ihre antimycotische Wirksamkeit zu prüfenden Sporenbildner punktförmig geimpft (siehe Abb. 2 u. 3). Das Bacillenimpfmateriel bestand aus einer 18stündigen Agarkultur.

Nach 10- bis 21-tägiger Bebrütung bei 22° C wurden die in dieser Weise angelegten Kulturen ausgewertet. Im Verlaufe dieser Zeit hatten sich im Pilzrasen um die Bacillenkolonien, deren Durchmesser zwischen 6 und 10 mm schwankte, mehr oder minder große Hemmzonen gebildet.

Die nachfolgend mitgeteilten Ergebnisse geben Durchschnittswerte über die Größe der Hemmzone an, die zwischen der Bacillenkolonie und dem Hauptpilzrasen gemessen wurde. Sie stützen sich jeweils auf 4 Paralleluntersuchungen. Hinsichtlich der Art der Hemmung wurde noch folgende Unterscheidung getroffen: 1. Totale Hemmung: Hemmzone völlig frei von Hauptpilzkolonien (siehe Abb. 4). 2. Schwach partielle Hemmung: Innerhalb der Hemmzone finden sich vereinzelt Pilzkolonien (siehe Abb. 5). 3. Stark partielle Hemmung: In der Hemmzone sind zahlreiche Pilzkolonien gewachsen (siehe Abb. 6).

B. Ergebnisse

Über den Anteil derjenigen Mikrobenstämme, die unter den insgesamt 200 aus der Luft bzw. dem Erdboden isolierten aeroben Sporenbildnern eine antimycotische Wirkung gegenüber den geprüften Hautpilzstämmen ausübten, gibt die Tab. 1 Auskunft.

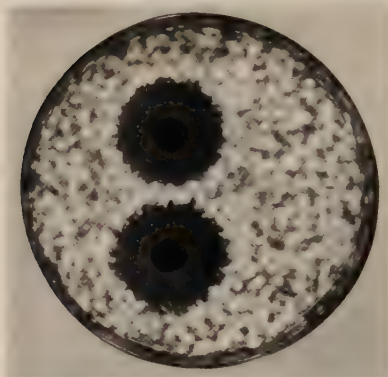


Abb. 4. Hautpilzkultur mit Höfen totaler Wachstumshemmung — Lochtestmethode

Ihr ist zu entnehmen, daß sich durchschnittlich 57% der geprüften Bacillenstämme als antimycotisch wirksam gegenüber den 3 untersuchten Hautpilzstämmen erwiesen haben. Aus der Tabelle ist weiterhin zu ersehen, daß der überwiegende Teil der antimycotisch wirksamen Sporenbildner eine totale Hemmung der Hautpilze hervorzurufen vermochte. 54% der antimycotisch aktiven Sporenbildner hemmten die Hautpilze

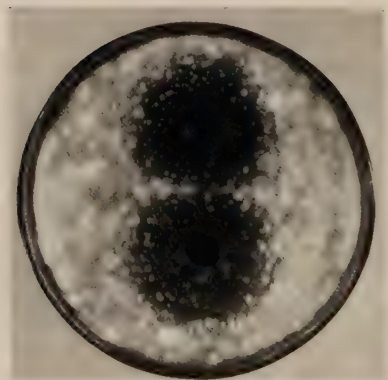


Abb. 5. Hautpilzkultur mit Höfen schwach partieller Wachstumshemmung — Lochtestmethode

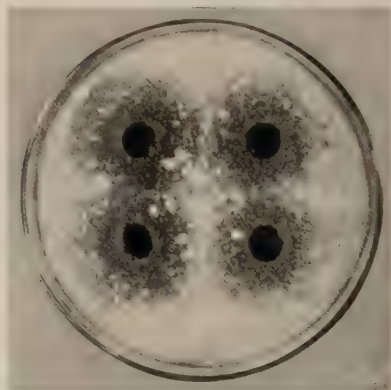


Abb. 6. Hautpilzkultur mit Höfen stark partieller Wachstumshemmung — Lochtestmethode

in der Weise, daß totale Hemmzonen in den dichten Pilzrasen der Agarkulturen entstanden. Die übrigen antagonistisch wirksamen Sporenbildner vermochten die Hautpilze nur schwach partiell oder stark partiell zu hemmen.

Eine ausgesprochen spezifische Wirkung einer bestimmten Sporenbildnerart gegenüber einem bestimmten Hautpilzstamm im Sinne eines spezifischen Antagonismus wurde nicht beobachtet. Insgesamt gesehen

erwies sich *Trichophyton rubrum* gegen die Stoffwechselprodukte der antimycotisch wirksamen Sporenbildner als etwas empfindlicher als *Trichophyton mentagrophytes* und *Microsporum canis*.

Tabelle 1. Von 200 aus der Luft bzw. dem Boden isolierten aeroben Sporenbildnern waren folgende Prozentanteile gegen pathogene Hautpilze wirksam

	Antimycotische Wirkung der aeroben Sporenbildner gegen		
	<i>Tr. mentagrophytes</i> %	<i>Tr. rubrum</i> %	<i>M. canis</i> %
Anzahl der geprüften Sporenbildner	200 = 100	100 = 100	200 = 100
Anteil der Spo. mit antimycotischer Wirkung davon bewirkten	56	65	50
totale Hemmung	27	39	26
schwach part. Hemmung	21,5	18	17,5
stark part. Hemmung	7,5	8	6,5
Anteil der Spo. ohne antimycotische Wirkung	44	35	50

Tabelle 2. Übersicht über die Intensität der antimycotischen Wirkung der 200 geprüften aeroben Sporenbildner

Größe der Hemmzone in mm	Antimycotische Wirkung der Sporenbildner gegen		
	<i>Tr. mentagroph.</i> %	<i>Tr. rubrum</i> %	<i>M. canis</i> %
<i>a) Sporenbildner mit totaler Hemmung</i>			
Insgesamt	27	39	26
davon 0,5— 2,5	4,5	1	2,5
2,6— 5,0	7,5	10	3
5,1—10,0	11,5	14	14,5
10,1—20,0	3,5	14	6,0
<i>b) Sporenbildner mit schwach partieller Hemmung</i>			
Insgesamt	21,5	18	17,5
davon 0,5— 2,5	9,5	3	5
2,6— 5,0	8,5	10	9
5,1—10,0	3,5	5	3,5
<i>c) Sporenbildner mit stark partieller Hemmung</i>			
Insgesamt	7,5	8	6,5
davon 0,5— 2,5	3,5	0	1
2,6— 5,0	3,0	5	3,5
5,1—10,0	1	3	2

Tab.2 gestattet einen Einblick in die Größenordnung der Hemmzonenbreiten. Da sich die Sporenbildnerkolonien auf Sabouraud-Agar bei 22° C innerhalb von 10 Tagen annähernd gleich groß entwickelten,

war ein Vergleich der antibiotischen Aktivität der Stämme für unsere orientierenden Untersuchungen statthaft.

Bei *Trichophyton rubrum* liegt der Anteil der totalen Hemmzonenbreiten von 10–20 mm besonders hoch.

Als weitere Folgeerscheinungen eines Antagonismus zwischen den Hauptpilzen und den Bacillen traten eine intensivere Farbstoffbildung auf der Unterseite und eine stärkere Luftmycelbildung auf der Oberfläche der Plattenkulturen an den Stellen auf, wo der engste Kontakt zwischen den Sporenbildnern und den Hauptpilzen bestand (siehe Abb. 3 u. 7).

Eine Förderung der Farbstoffbildung wurde von 30% der geprüften Bacillen bewirkt. Bacillen mit dieser Eigenschaft regten die Farbstoffbildung bei allen verwendeten Hauptpilzarten an. Es handelt sich um ein rotbraunes Pigment auf der Unterseite der Kultur von *Tr. mentagrophytes*, um ein gelbes Pigment bei *M. canis* und ein gelbes oder rotes bei *Tr. rubrum*. Diese Reaktion seitens der Hauptpilze ist nicht spezifisch, denn sie konnte auch beim Nebeneinanderwachsen von Schimmel- und Hauptpilzen beobachtet werden. Demnach handelt es

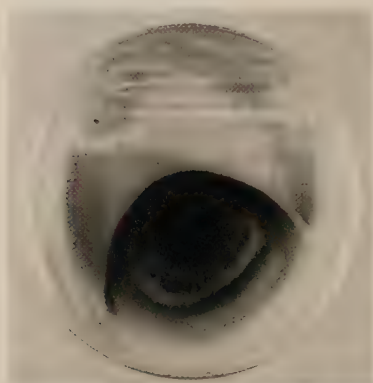


Abb. 7. Förderung der Pigmentbildung auf der Unterseite einer Kolonie von *Trichophyton mentagrophytes* (unten) durch den antimycotischen Einfluß einer *Bacillus subtilis*-Kolonie (oben)

sich auch im vorliegenden Falle lediglich um eine der allgemeinen Reaktionsformen pathogener Hauptpilze auf den Einfluß von Mikroben.

II. Untersuchungen über den antimycotischen Wirkstoff des aeroben Sporenbildners *Bacillus subtilis*₁

Im folgenden wurde versucht, über die Natur des von den Bacillen produzierten antimycotischen Wirkstoffes nähere Aufschlüsse zu erhalten. Für diese speziellen Untersuchungen wurde auf den anfangs beschriebenen Stamm *Bacillus subtilis*₁ zurückgegriffen. Dieser konnte wie auch die übrigen antimycotisch besonders aktiven Bacillen nach BERGEY's Manual (1948) als *Bacillus subtilis* identifiziert werden. Das besondere Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, einige physiologische Eigenschaften des antimycotischen Wirkstoffes aufzuklären und darüber hinaus festzustellen, unter welchen Bedingungen dieser Stoff gebildet wird.

Heute sind zahlreiche aus den Bacillenleibern oder den Kulturen von *Bacillus subtilis* gewonnene Antibiotica bekannt. Welchem von diesen

der hier untersuchte antimycotische Wirkstoff angehört, muß der chemischen Untersuchung überlassen bleiben. In den zuvor beschriebenen Versuchen zeigte der antagonistisch wirksame Stoff des Sporenbildners ein gutes Diffusionsvermögen im Agar, was aus der Abb. 8 deutlich zu ersehen ist.

Er übt somit eine gewisse Fernwirkung auf die Pilze aus, die mehrere Wochen anhält. Auf Grund entsprechender Vorversuche stellte sich heraus, daß der Hemmstoff filtrabel ist, d.h. im sterilen Kulturfiltrat der Sporenbildner enthalten ist. Für die vergleichenden quantitativen Untersuchungen wurden daher entsprechende Kulturfiltrate dieses Stammes verwendet.

A. Methodik

Für die quantitative Testung der Kulturfiltrate des Sporenbildners wurde der Agarlochtest herangezogen. Die Petrischalen (\varnothing 8 cm) wurden mit je 11,5 ml Sabouraud-Agar (2% Dextrose; 1% Myco-pepton B; aqua dest.; 2,5% Agar) versehen, der 5000 Conidien je Milliliter enthielt. Anschließend wurden je Platte mehrere Löcher mit einem Durchmesser von 10 mm ausgestanzt und in jedes Loch 0,05 ml des zu testenden Kulturfiltrats des Sporenbildners gegeben. Nach 7- bis 10tägiger Bebrütung bei 22° C wurde der Durchmesser der Hemmhöfe als Mittelwert von 4 parallelen Testen festgestellt (siehe Abb. 4—6).

Als Impfmateriale dienten gut versportete 10 Tage alte Hautpilzkulturen auf Malz-extraktagar. Die Pilze waren kurz zuvor aus Patientenmaterial isoliert worden. Stämme folgender Species wurden verwendet: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum canis* und *Epidermophyton floccosum*.

Die aeroben Sporenbildner wurden bei 37° C in 100—200 ml verschiedener Lösungen kultiviert (vgl. weiter unten). Nach bestimmten zeitlichen Intervallen wurde ein Teil des Kulturmediums durch G5-Bakterienfilter von Schott u. Gen. (Jena) filtriert und im Lochtest gegen verschiedene Hautpilze getestet.

B. Ergebnisse

1. Der Einfluß der Zusammensetzung des Kulturmediums auf die Hemmstoffbildung von *Bacillus subtilis*₁

Um das für die Ausbildung der antimycotischen Aktivität am besten geeignete Medium herauszufinden, wurden für die Kultur von *Bacillus subtilis*₁ Nährböden verschiedener Art herangezogen, worüber die Tab. 3 näheren Aufschluß gibt.



Abb. 8. Fernwirkung der *Bacillus subtilis*-Kolonie (oben) auf Kolonien von *Trichophyton rubrum* (unten)

Im allgemeinen war der von dem Teststamm gebildete antagonistisch wirkende Stoff zwischen dem 16. und 18. Kulturtag gut ausgebildet. Eine wesentliche Intensitätssteigerung konnte durch längeres Bebrüten der Kulturen nicht erzielt werden. Eine deutliche Verminderung der antimycotischen Aktivität war erst von der 12.—15. Bebrütungswoche

Tabelle 3. *Einfluß der Zusammensetzung des Nährmediums auf die Wirkungsintensität der Sporenbildner*

Nährmedium	Antimycotische Wirkung gegen			
	<i>Tr. mentagr.</i>	<i>Tr. rubrum</i>	<i>E. floccosum</i>	<i>M. canis</i>
1. Hefebouillon	0	0	0	0
2. Fleischbouillon mit Mykopepton B	0	0	0	0
3. Fleischbouillon mit Wittepepton	0	++ p	0	+++ p
4. Hefeb., 1% Dextr.	++ p	++ p	+++ p	+++ p
5. Hefeb., 2% Dextr.	++ p	+++ p	+++ t	+++ p
6. Hefeb., 4% Dextr.	++++ p	++++ p	++++ t	++++ p
7. Hefeb., 6% Dextr.	+++ p	+ p	++ p	++ p
8. Hefeb., 8% Dextr.	++ p	+ p	++ p	++ p
9. Fleischb., 4% Dextr. Mykopepton A	+ p	+++ (p)	+ p	++ p
10. Fleischb., 4% Dextr. Mykopepton B	+ p	+++ (p)	+ p	++ p
11. Fleischb., 4% Dextr. Wittepepton	+ p	+++ p	0	0
12. Hefeb., 2% Lactose	+ p	+++ p	++ p	++ p
13. Hefeb., 2% Maltose	++ p	+++ p	++++ t	++ p
14. Hefeb., 2% Sacch.	++ p	+++ p	+++ t	++ p
15. Hefeb., 4% Sacch.	0	(+) p	0	0

Zeichenerklärung: t = totale Hemmung; p = partielle Hemmung; (p) = sehr schwache partielle Hemmung; + + + + = Hemmhofdurchmesser bis 35 mm; + + + + = Hemmhofdurchmesser bis 30 mm; + + + = Hemmhofdurchmesser bis 25 mm; + + = Hemmhofdurchmesser bis 20 mm; + = Hemmhofdurchmesser bis 15 mm; (+) = Hemmhofdurchmesser kleiner als 15 mm; 0 = ohne antimycotische Wirkung.

an bei 37° C festzustellen. Aus der Tab.3 ist die Wirkung der verschiedenen Kulturmedien auf die antimycotische Aktivität von *Bacillus subtilis*₁ ersichtlich. Aus ihr geht hervor, daß die Zusammensetzung des Nährmediums einen beachtlichen Einfluß auf die antagonistische Wirkung der Filtrate hat. Nährbrühen, die lediglich auf Hefeextrakt- oder Fleischwasserbasis hergestellt wurden, vermögen die Bildung des

Hemmstoffes durch den *Bacillus* so gut wie nicht zu induzieren. Durch Zusätze von Kohlenhydraten, vor allem Dextrose, Maltose und Saccharose, erfährt die antimycotische Aktivität des *Bacillus* eine zum Teil sehr erhebliche Steigerung. Bei dem Zusatz von Dextrose steigert sich die Ausbildung des Hemmstoffes bis zu einem 4%igen Dextrosegehalt, um bei höheren Zugaben dieses Kohlenhydrates zum Nährboden (6% und 8%) wieder abzunehmen. Eine ähnliche Beeinflussung hinsichtlich der antimycotischen Wirkungsintensität kann bei Saccharosezusätzen beobachtet werden. Ein Vergleich der Medien Nr. 6, 9, 10 und 11 ergibt weiterhin, daß die Hefebouillonmedien für die Entwicklung des antimycotischen Stoffes des Testbacillus besser geeignet sind als die Fleischbouillonmedien. Auf Grund dieser Befunde wurde für die weiteren Untersuchungen 4%ige Dextrose-Hefe-Brühe als Kulturmedium für *Bacillus subtilis*₁ verwendet.

2. Der Einfluß der Bebrütungstemperatur auf die Hemmstoffbildung von *Bacillus subtilis*₁

Die mit dem *Bacillus subtilis*₁ beimpften flüssigen Kulturen wurden zur Beantwortung der Frage über den Temperatureinfluß auf die antimycotische Hemmstoffbildung in Parallelreihen bei 37°, 28° und 22° C für die Dauer von 18–21 Tagen bebrütet. Das nach diesen Bebrütungszeiten und -temperaturen aus den Kulturen gewonnene Filtrat wurde auf seine antagonistische Wirkung gegenüber Hautpilzen getestet. Als Ergebnis dieser Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß die Temperatur von 37°C optimal für die Bildung des antimycotischen Wirkstoffes zu sein scheint, da bei den Kulturen, die bei 28° bzw. 22° C bebrütet wurden, die Hemmwirkung wesentlich später und abgeschwächer im Vergleich zu den erstgenannten Kulturen auftrat.

3. Der Einfluß des pH-Wertes auf die antagonistische Wirkung der Kulturfiltrate von *Bacillus subtilis*₁

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob der Anfangs-pH-Wert der Sporenbildnerkulturen die Bildung des antimycotischen Hemmstoffes beeinflusst. Es wurden *B. subtilis*₁-Kulturen in 4%iger Dextrosebouillon angelegt, die mit Milchsäure auf verschiedene pH-Werte (9; 8; 7,2; 6; 5 und 4) eingestellt worden waren. Nach einer 18tägigen Bebrütungsdauer bei 37° C wurden daraus sterile Kulturfiltrate gewonnen, die in der oben beschriebenen Weise auf ihre Wirksamkeit gegen die Hautpilze ausgetestet wurden. Dabei stellte es sich heraus, daß die Kulturmedien, deren pH-Wert im Bereich zwischen 4 und 5 lag, für die Ausbildung des Hemmstoffes ungeeignet sind, da der Teststamm in diesem sauren Milieu nur schlecht wächst und demzufolge auch hinsichtlich der Produktion des antimycotischen Wirkstoffes gehemmt ist.

Die Kulturfiltrate der Medien mit den Anfangs-pH-Werten zwischen 9 und 6 zeigten eine annähernd gleich starke Hemmwirkung.

In weiteren Untersuchungen wurde geprüft, ob durch nachträgliche pH-Wert-Änderungen des Kulturfiltrates, das aus einer normal eingestellten Bouillon-Kultur (pH 7,2) gewonnen wurde, die Aktivität des darin enthaltenen Hemmstoffes beeinflußt werden kann. Gemäß dieser Fragestellung wurden entsprechende Kulturfiltrate, deren pH-Wert normalerweise zwischen 6,8 und 7,6 lag, gewonnen und diese mit n/10 NaOH bzw. n/10 HCl auf folgende pH-Werte eingestellt: 9,0; 8,6; 8,0; 6,0; 5,0 und 4,2. Die Testung dieser Kulturfiltrate gegenüber Hautpilzen ergab, daß keine wesentlichen Veränderungen ihrer antagonistischen Wirkung im Bereich von pH 5 bis pH 9 auftreten. Oberhalb und unterhalb dieses Bereiches war eine geringe Verminderung zu verzeichnen.

4. Der Einfluß der Temperatur auf die antimycotische Wirksamkeit der Sporenbildner-Kulturfiltrate

Im folgenden wurde die Temperaturempfindlichkeit der Hemmwirkung der Kulturfiltrate von *Bacillus subtilis*₁ untersucht. Antimycotisch besonders wirksame Kulturfiltrate wurden zu diesem Zweck

Tabelle 4. Der Einfluß der Temperatur auf die antimycotische Aktivität der Kulturfiltrate von *Bacillus subtilis*₁

Temperatur	Aufbewahrungsdauer	Wirkung
4° C	60 Tage	sehr geringe Verminderung
	80 Tage	geringe Verminderung
22° C	28 Tage	sehr geringe Verminderung
	84 Tage	geringe Verminderung
100° C (Wasserbad)	60 min	keine Verminderung
	75 min	geringe Verminderung
100° C (Dampftopf)	30 min	keine Verminderung
	60 min	geringe Verminderung
120° C (Autoklav)	20 min	keine Verminderung
	30 min	geringe Verminderung
	60 min	starke Verminderung

verschieden lange unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt und anschließend in üblicher Weise gegen Hautpilze getestet. Dabei zeigte es sich, daß der antagonistische Wirkstoff sowohl gegen niedrige als auch gegen höhere Temperaturen nur wenig empfindlich ist. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tab.4 zusammengefaßt.

5. Der Einfluß von Serum auf die antimycotische Wirkung der Kulturfiltrate von *Bacillus subtilis*₁

Im Hinblick auf die mögliche therapeutische Anwendung der aus aeroben Sporenbildnern gewonnenen antimycotischen Wirkstoffe ist es bedeutungsvoll, zu erfahren, ob ihre Wirksamkeit durch tierisches Serum verändert wird. In den folgenden Versuchsreihen wurde daher 4% inaktiviertes Rinderserum dem Sabouraud-Agar zugesetzt und dieses Substrat in üblicher Weise für die Prüfung der antimycotischen Wirkung der Kulturfiltrate gegenüber den pathogenen Hautpilzen mit dem Lochtest verwendet. In allen untersuchten Fällen wurde durch den Serumzusatz die antagonistische Wirkung der Filtrate aufgehoben. Das Wachstum der Pilze glich dem der mitgeführten Kontrollkulturen.

6. Zum antibiotischen Wirkungsspektrum der Kulturfiltrate von *Bacillus subtilis*₁

Um die bisher nur an einer kleineren Zahl von pathogenen Hautpilzen erzielten Resultate erhärten zu können, wurden die Kulturfiltrate von *B. subtilis*₁ gegenüber einer größeren Zahl von Hautpilzstämmen, die den folgenden Arten angehören, in der weiter oben beschriebenen Weise im Lochtest geprüft: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* und *Candida albicans*. Das Ergebnis faßt die Tab.5 zusammen.

Tabelle 5. Antagonistische Wirkung von Kulturfiltraten des *Bacillus subtilis*₁ auf Hautpilze

Pilzart	Anzahl der Stämme	Stärke der Hemmwirkung						
		+++++	++++	+++	++	+	(+)	0
<i>Tr. mentagr.</i>	43	—	2	8	18	13	2	—
<i>Tr. rubrum</i>	27	3	13	9	1	1	—	—
<i>Tr. tonsurans</i>	1	—	—	—	—	—	1	—
<i>E. floccosum</i>	4	—	4	—	—	—	—	—
<i>M. canis</i>	1	—	1	—	—	—	—	—
<i>C. albicans</i>	1	—	—	—	—	—	—	1
Insgesamt	77	3	20	17	19	14	3	1

Erklärung der Zeichen siehe Tab.3.

Die Kulturfiltrate des Sporenbildners erwiesen sich gegen alle getesteten Hautpilzstämmen außer *Candida albicans* als antibiotisch wirksam. *Tr. rubrum*, *M. canis* und *E. floccosum* wurden im allgemeinen stärker gehemmt als *Tr. mentagrophytes*.

Den Abschluß dieser Versuchsreihen bilden Untersuchungen über die antagonistische Wirkung der Kulturfiltrate von *B. subtilis*₁ auf Bakterien.

Diese Untersuchungen sollten zur weiteren Charakterisierung des antimycotischen Wirkstoffes beitragen. Das antibiotische Wirkungsspektrum des geprüften Hemmstoffes gegenüber verschiedenen Bakterienarten ist etwa folgendes: Gehemmt wurde im Lochtestversuch das Wachstum von *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, *Escherichia coli* und *B. subtilis* (Sammlungskultur). Keine Wachstumseinschränkungen waren bei *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Alcaligenes faecalis*, *Corynebacterium diphtheriae* und hämolysierenden Streptokokken zu verzeichnen. Bei diesen Versuchen wurde an Stelle des Pilzagars ein gewöhnlicher Agar verwendet.

Schlußbetrachtungen

Da der Erdboden ein natürliches Reservoir für einige pathogene Pilze ist, unter denen sich auch pathogene Hautpilze befinden (JADASSOHN 1928, NICKERSON 1953, FREY u. DURIE 1956, AJELLO 1956), ist es vom epidemiologischen Standpunkt aus von Bedeutung, die verschiedenartigen mikrobiellen und chemischen Einflüsse des Bodens auf Pilzsporen dieser Art zu kennen. Da einerseits der chemische Stoffhaushalt des Bodens, bei dem die Wechselbeziehungen der in ihm enthaltenen Mikroben eine große Rolle spielen und von sehr komplexer und bisher nicht vollständig zu übersehender Natur sind, andererseits aber das Auffinden gut wirksamer antimycotischer Stoffe bisher im Vordergrund des Interesses stand, wurden meist die antagonistisch wirksamen Keime von ihrem natürlichen Milieu getrennt und mit Hilfe der üblichen *in vitro*-Methoden geprüft und beurteilt.

Durch die eingangs erwähnten Untersuchungen dieser Art (SCHATZ u. HAZEN, USA, 1948 und URI, Ungarn, 1957) ist es bekannt geworden, daß ein hoher Prozentsatz der im Boden lebenden Actinomyceten gegenüber pathogenen Hautpilzen antagonistisch wirkt. Den Bodenbakterien messen SCHATZ u. HAZEN dagegen keine besondere Bedeutung bezüglich eines wirksamen Antagonismus gegen menschenpathogene Pilze zu.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Gültigkeit dieser Feststellung für die hiesige Mikrobenflora an Hand von 200 aus dem Erdboden sowie dem Luftraum stammenden Bacillen und pathogenen Hautpilzstämmen, die 3 verschiedenen Species angehören, geprüft. Entgegen den Erfahrungen von SCHATZ u. HAZEN (1948) zeigte sich bei diesen Untersuchungen, daß ein hoher Prozentsatz der im Boden lebenden aeroben Sporenbildner *in vitro* eine antimycotische Aktivität gegenüber pathogenen Hautpilzen entfalten kann. *Trichophyton mentagrophytes* wurde von 56% und *Microsporum canis* von 50% der 200 geprüften Bacillenstämme, *Trichophyton rubrum* sogar in 65% der Erdbacillen am Wachstum behindert.

In diesem Zusammenhang erhebt sich die Frage, inwieweit die antibiotischen Stoffe der Erdbacillen unter den natürlichen Bedingungen die im Boden saprophytisch lebenden Sporen pathogener Pilze schädigen können. Mit dieser Frage ist eine weitere auf das engste verknüpft, nämlich die, ob dem Erdboden, der als natürliches Sporenreservoir für einige pathogene Hautpilze angesehen werden kann, de facto eine so große epidemiologische Bedeutung zukommt, wie es von manchen Autoren angenommen wird (JADASSOHN 1928, SEELIGER 1956). Zur Beantwortung dieser Fragen sind indessen noch umfangreiche Untersuchungen erforderlich, die sich eingehend mit der antimycotischen Aktivität der Bodenmikroben am natürlichen Standort und dem Auffinden weiterer im Boden saprophytisch lebender pathogener Hautpilze befassen müssen. Bisher konnte vor allem *Microsporum gypseum* aus diesem Milieu isoliert werden (FREY u. DURIE 1956).

Bei der Erörterung der aufgeworfenen Fragen dürfen die Untersuchungen von JEFFREYS (1952) nicht unberücksichtigt bleiben, der eine Inaktivierung antibiotischer Stoffe im Erdboden feststellte. Danach bestünde unter Umständen die Möglichkeit, daß die Hemmstoffe der Bacillen ihre antimycotische Wirkung im Boden nicht oder nur in abgeschwächtem Maße entfalten könnten. Als Ursache für die beobachtete Verminderung der Stabilität der Antibiotica im Erdboden werden eine biologische Inaktivierung, die Absorption durch basische Moleküle sowie verschiedene Arten einer chemischen Inaktivierung und die Acidität des Bodens angesehen.

Ferner ist zur Beantwortung der aufgestellten Fragen die Tatsache zu beachten, daß sich die pathogenen Hautpilze auch ihrerseits auf Grund ihres Vermögens, verschiedene Antibiotica zu bilden, aktiv in die Wechselbeziehungen innerhalb der Mikrobenpopulationen des Bodens einschalten können (CIFERRI 1948, MALLINCKRODT u. Mitarb. 1956, URI 1957).

So konnte URI beispielsweise einen antibiotisch wirksamen Stoff als Penicillin identifizieren, den Hautpilzstämme der Gattungen *Trichophyton* und *Epidermophyton* während ihres normalen Wachstums auf Haut- und Haarteilchen sezernieren. Bisher unbekannt blieb die Bedeutung dieser antagonistischen Stoffwechselprodukte der Hautpilze für die Mikrobenpopulation, die die Pilze am Ort ihres natürlichen Vorkommens vorfinden.

Es bestünde demzufolge die Möglichkeit, daß der in vitro beobachtete Antagonismus zwischen den aeroben Sporenbildnern und pathogenen Hautpilzen ohne nennenswerten Einfluß auf die Lebensfähigkeit der Pilzsporen im Boden ist.

Das Bildungsvermögen von antimycotisch wirksamen Stoffwechselprodukten ist bei den im Erdboden vorgefundenen Bacillenarten in

verschieden starkem Maße ausgebildet. Innerhalb der 200 geprüften Stämme zeichnet sich *B. subtilis* durch eine besonders starke Hemmwirkung auf pathogene Hautpilze aus. Der antimycotische Wirkstoff konnte in den sterilen Kulturfiltraten der Sporenbildner nachgewiesen werden.

Sieht man von *Candida albicans* ab, die in keiner Weise durch die antimycotischen Wirkstoffe der Bacillen in ihrem Wachstum beeinflusst wird, so kann man von einer starken Beeinflussung der geprüften Pilzstämme der Gattungen *Trichophyton*, *Epidermophyton* und *Microsporum* sprechen. Die 5 in den Versuch genommenen Species reagierten auf den Wirkstoff eines Sporenbildners im allgemeinen in der gleichen Weise und Stärke, wobei das Reaktionsgeschehen in Form einer Wachstumshemmung bzw. in der erwähnten Förderung der Luftmycel- oder Farbstoffbildung zum Ausdruck kommt. Dieses gleichgerichtete Verhalten der verschiedenen Arten der pathogenen Hautpilze spricht doch für ihre zumindest sehr ähnliche Lebensweise.

Abgesehen von diesen Phänomenen wurden an den Pilzhypen sämtlicher verwendeter Hautpilzstämme ungewöhnliche morphologische Veränderungen beobachtet, sobald sie in flüssigen Medien gezüchtet wurden, die mit einem Zusatz der Hemmstoffe der aeroben Sporenbildner versehen worden waren. In diesem Falle treten nämlich eigenartige kugelige Auftreibungen an den Hyphen auf, worüber an anderer Stelle berichtet werden soll*.

Die Versuche zeigten insgesamt, daß die Hemmstoffe der Bacillen eine fungistatische Wirkung haben.

Die nähere Prüfung der Eigenschaften des antimycotischen Wirkstoffes eines *Bacillus subtilis*-Stammes ergab, daß die Bildung der antagonistischen Aktivität der Kulturfiltrate weitgehend von der Nährbodenzusammensetzung abhängig ist. Ohne Kohlenhydratzusatz wurde keine oder nur eine geringe Menge hemmender Substanz gebildet. Besonders fördernd wirkte Dextrose. Ähnliche Beobachtungen finden sich bei LEWIS u. Mitarb. (1946) sowie SCHATZ u. HAZEN (1948). Ebenso förderten Zusätze von Hefeextrakt die Hemmstoffbildung der Bacillen. Die Abhängigkeit der antimycotischen Wirkungsintensität von den Stoffen des Kulturmediums läßt darauf schließen, daß die Synthese des Hemmstoffes die Folge eines spezifischen Stoffwechselgeschehens der Bacillen ist. Die Tatsache, daß die Hemmwirkung erst vom 16. Kulturtag des Sporenbildners an voll entwickelt und in den ersten 7 Tagen nicht nachweisbar ist, weist darauf hin, daß der fungistatische Stoff vor allem durch den Zerfall der Bacillenleiber frei wird. — Bemerkenswert sind die Hitzeresistenz dieses Hemmstoffes und die Beobachtung, daß seine Aktivität innerhalb eines großen p_H -Bereiches (p_H 5— p_H 9) erhalten bleibt.

* Diese Arbeit erscheint im Zentralblatt für Bakteriologie, Abteilung I, Originale.

Über die chemische Natur der in dieser Arbeit erfaßten antimycotischen Stoffwechselprodukte aerober Sporenbildner kann noch keine Aussage gemacht werden. Da sich alle Stämme, die sich bei den vorliegenden Untersuchungen als besonders antimycotisch wirksam erwiesen, bei der Artbestimmung als Angehörige der Species *Bacillus subtilis* herausstellten, kann wohl mit Recht angenommen werden, daß die Hemmstoffe zu der Gruppe der zahlreichen Antibiotica gehören, die aus *Bacillus subtilis* oder seinen Kulturmedien bereits gewonnen und beschrieben worden sind. So ist eine antimycotische Wirkung vom Subtilin, Eumycin, Bacillomycin und Mycobacillin bekannt. Die Anwendung dieser Präparate für die Therapie der Mycosen muß aber durch die Klinik noch weiter erprobt werden (KIMMIG 1950). Zum Teil steht nämlich ihrem therapeutischen Einsatz ihre zu hohe Toxizität — wie z. B. die des Subtilins — als Hinderungsgrund entgegen. — Die Beobachtung, daß ein Serumzusatz die Aktivität des Hemmstoffes gegenüber Hautpilzen aufhebt, deutet darauf hin, daß zwischen den Ergebnissen der in vitro- und in vivo-Testung, d. h. der praktischen erfolgreichen Anwendung dieser Stoffe, doch Diskrepanzen zu befürchten sind.

Zusammenfassung

1. 200 aerobe Sporenbildner, die aus der Luft bzw. dem Erdboden gezüchtet worden waren, wurden auf ihre antimycotische Wirkung gegenüber pathogenen Hautpilzen mittels einer Diffusionstestmethode untersucht. 112 (56%) von diesen Bacillen erwiesen sich gegenüber *Trichophyton mentagrophytes*, 130 (65%) gegenüber *Trichophyton rubrum* und 100 (50%) gegenüber *Microsporum canis* als antimycotisch wirksam. Die Species *Bacillus subtilis* zeichnete sich durch eine besonders starke antimycotische Wirkung aus.

Die Bedeutung des hohen Anteils antimycotisch wirksamer Sporenbildner im Erdboden für die in diesem Milieu saprophytär lebenden pathogenen Hautpilze wird erörtert.

2. Das antimycotisch wirksame Prinzip dieser Bacillen ist im sterilen Kulturfiltrat von 16—18 Tage alten bei 37° C bebrüteten Kulturen nachweisbar. Die relativ lange Zeitdauer bis zum Auftreten des Hemmstoffes spricht mit Wahrscheinlichkeit dafür, daß es sich dabei um Zerfallsprodukte der Bacillen handelt.

3. Die Eigenschaften des antimycotischen Stoffes, der von einem antimycotisch besonders wirksamen Stamm der Species *Bacillus subtilis* gewonnen worden war, wurde näher untersucht. Dabei ergab sich, daß das Antibioticum einen fungistatischen Effekt gegen die Hautpilze *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum canis* und *Epidermophyton floccosum* ausübte. Unbeeinflusst blieb *Candida albicans*. Die Bildung des antagonistischen

Wirkstoffes wurde in Nährlösungen mit Hefeextraktzusatz und 4% Dextrose besonders gefördert. Der Hemmstoff war gegenüber pH -Werten im Bereich von pH 5 bis pH 9 und gegenüber Temperaturen von 100° bis 4° C relativ unempfindlich. Ein Zusatz von inaktiviertem Serum zum Testmedium hebt die antimycotische Wirkung auf.

Literatur

- AJELLO, L.: *Science* **123**, 876 (1956). — *BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology*, London 1948. — CHAMBERS, S. O., u. F. B. WEIDMAN: *Arch. Derm. Syph. (Chicago)* **18**, 568 (1928). — CIFERRI, R.: *Mycopathologia (Den Haag)* **3**, 219 (1948). — DUBOS, R. J., and C. J. CATTANEO: *J. exp. Med.* **70**, 249 (1939). — FREY, D. M., and E. B. DURIE: *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* **34**, 199 (1956). — JADASSOHN, J.: *Handbuch f. Haut- u. Geschl.-Krh.*, Bd. XI, *Dermatomykosen*, 1928. — JANSEN, E. F., and D. J. HIRSCHMANN: *Arch. Biochem.* **4**, 297 (1944). — JEFFREYS, E. G.: *J. gen. Microbiol.* **7**, 295 (1952). — KATZNELSON, H.: *Canad. J. Res., Sect. C* **20**, 169 (1942). — KIMMIG, J.: *Dtsch. med. Wschr.* **1950**, 1137. — LANDY, M., G. WARREN, S. ROSENMAN and L. COLIO: *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **67**, 539 (1948). — LEWIS, M. G., M. E. HOPPER and S. SCHULTZ: *Arch. Derm. Syph. (Chicago)* **54**, 300 (1946). — MAJUMDAR, S. K., and S. K. BOSE: *Sci. Industr. Res.* **14**, C, 126 (1955). — MALLINCKRODT-HAUPT, A. u. a.: *Mycopathologia (Den Haag)* **7**, 261 (1956). — NICKERSON, W. J.: *Ann. Rev. Microbiol.* **7**, 245 (1953). — SEELIGER, H. P. R.: *Röntgen- u. Lab.-Praxis* **9**, 193 (1956). — SCHATZ, A., and E. L. HAZEN: *Mycologia (N. Y.)* **40**, 461 (1948). — URI, J.: *Pharmazie* **12**, 194 (1957). — URI, J., S. SZATHMARY u. Z. S. HERPAY: *Pharmazie* **12**, 485 (1957). — WOZNICKA, W., H. NIEMCZYK u. Z. MAKAROWSKA: *Med. doświadcz. i mikrobiol.* **9**, 57 (1957).

(From the Retina Foundation, Department of Ophthalmology of the Massachusetts Eye and Ear Infirmary and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts)

The Sterilizing Effect of Ethylene Oxide Vapor on Different Micro-Organisms*

By

L. Z. J. TOTH

With 1 figure in the text

(Eingegangen am 18. November 1958)

Ethylene oxide has long been recognized as an effective sterilizing agent. In recent years its use has shown a rapid increase when heat sterilization could not be applied. The principal facts and problems involved have been summarized by PERKINS (1956) and by SYKES (1958) in their recent books. Since ethylene oxide sterilization is a relatively new method, more data are needed to clarify the microbicidal properties and the lethal effect of this gas on different micro-organisms. The purpose of this paper is to supply some comparative data on the lethal effect of ethylene oxide gas on various micro-organisms.

To establish a basis for the comparison of the lethal effect of ethylene oxide on different micro-organisms, environmental factors must be kept constant. In addition to the gas concentration and the exposure time, other factors which may influence the lethal effect are: humidity, temperature, culture medium, and method of inoculation.

The experiments reported in this paper were carried out at 30—40% relative humidity (measured with approximate accuracy by an "Airguide" hygrometer within the chamber) at approximately 22°C in a 150 mm Hg vacuum with Bacto Heart Infusion Agar medium (Difco) in Petri dishes to which one loopful inoculum was transferred in one streak. In the case of moist loads such as agar plates, etc., the amount of material to be sterilized had to be restricted in order to prevent an increase in the relative humidity. A glass desiccator or a Plexiglass box equipped with a vacuum gauge, an air filter for germ-free air intake, and a valve for gas intake and for evacuation was used as a sterilizing chamber.

Following sterilization with ethylene oxide the Petri dishes were incubated at 30°C, and the daily growth was recorded. For comparison, the same micro-organisms grown under identical conditions were used as unsterilized controls. These culturing conditions are, of course, not equally good for all micro-organisms, but make it possible to compare the effect of the lethal agent under the same culturing conditions, since the amount of residual ethylene oxide in the culture medium is the same.

* This investigation was supported in part by a research grant [B-633 (C 2)] from the National Institute of Neurological Diseases and Blindness, Public Health Service, and by the Charles Irwin Travelli Fund.

Paper 65, Retina Foundation.

The curves in Fig. 1 represent the averages of a large number of experimental data (150—200) for each group and at least 30 for each individual species. They clearly demonstrate the wide range of susceptibility of the different micro-organisms to ethylene oxide. The individual curves may be easily grouped in three separate categories of susceptibility. The spore-

forming bacilli show the greatest resistance and require the highest concentration of the sterilizing agent to be killed (about 350 mg of ethylene oxide per liter for a period of 16 hrs). Of course, their vegetative cells would be killed at a lower concentration and/or within a shorter time, but below this high limit their spores might survive. In order to

establish tests for ensured sterility, glass beads, filter paper strips, plastic capillaries, rubber tubing, etc., were sprayed with a suspension of *Bacillus subtilis* spores, which were then air dried and incubated in Heart Infusion broth (Difco). Gas concentration and exposure time are most closely related. The longer the exposure time, the lower the concentration of gas necessary to kill the

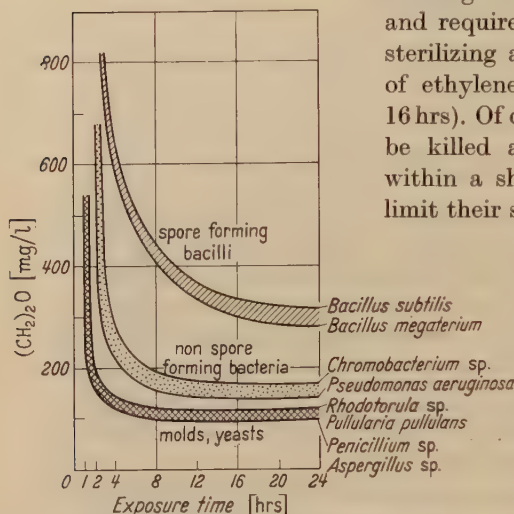


Fig. 1. Lethal effect of ethylene oxide on various micro-organisms. Relative humidity 30%, temperature 22° C

micro-organisms. The nonspore forming bacteria were killed with a concentration of ethylene oxide half as great as that needed to destroy the spore-forming bacteria. The lethal concentration for yeasts is still lower. The poor resistance of the molds against ethylene oxide is somewhat surprising.

Zusammenfassung

Äthylenoxyd-Gas ist ein effektives Sterilisierungsmittel. Konzentration und Sterilisierungszeit sind voneinander abhängig. Je länger die Wirkungszeit, desto geringer die lethale Gaskonzentration. Bezüglich ihrer Widerstandsfähigkeit lassen sich die Mikroorganismen in drei Gruppen einteilen (Abb. 1). Am meisten resistent sind die sporenbildenden Bakterien. Sie vertragen eine zweifach so hohe Konzentration als die nicht sporenbildenden. Auffallend niedrig liegt die tödliche Grenze für Hefe und Schimmelpilze.

References

- PERKINS, J. J.: Principles and methods of sterilization. Springfield, Mass. Ch. C. Thomas 1956. — PHILLIPS, C. R., and S. KAYE: The sterilizing action of gaseous ethylene oxide, I, Review. Amer. J. Hyg. 50, 270—279 (1949). — SYKES, G.: Disinfection and sterilization. Princeton: D. van Nostrand 1958.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen)

Über *Phlyctochytrium reinboldtae* n. sp.

Von
INGETRAUD PERSIEL

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 3. November 1958)

1951 hat REINOLDT aus einer wäßrigen Aufschwemmung von Erde des Botanischen Gartens in Göttingen, der *Pinus*-Pollen als Köder zugegeben war, ein *Phlyctochytrium* (*Phycomycetes*; Ordnung *Chytridiales*, Familie *Phlyctidiaceae*) isoliert, das sich als neue Art erwies. Fräulein REINOLDT hat eine Beschreibung des Pilzes mit Abbildungen der verschiedenen Entwicklungsstadien gegeben; die Art blieb aber unbenannt. Seitdem wurde der Pilz nicht nur aus weiteren europäischen Bodenproben isoliert (HARDER 1954, GAERTNER 1954₁, HARDER u. UEBELMESSER 1955 und 1957, SCHOLZ 1958), sondern er konnte auch aus Erden Afrikas (GAERTNER 1954₁), Australiens (HARDER u. GALLWITZ-UEBELMESSER 1959) und Amerikas (schriftliche Mitteilungen 1958 von W. J. KOCH sowie F. K. SPARROW) mit Pollen herausgeködert werden.

Ich selbst habe ihn in Erdproben aus dem Göttinger Botanischen Garten und aus der Umgebung Göttingens sowie in einem Kartoffelacker, einer gedüngten Mähwiese im inneren Ötztal, weiter in bewachsenem Moränenschutt (Ötztal) und schließlich unter *Dryas octopetala* bei Innsbruck gefunden.

Der Pilz besiedelt also Böden der verschiedensten physikalischen und chemischen Beschaffenheit.

Das typische Merkmal der Art sind die kurzen, kegelförmigen Entleerungshälsen, die dem reifen \pm kugligen Sporangium ein charakteristisches morgensternförmiges Aussehen geben (Abb. 1; REINOLDT, Abb. 9 g h k l; GAERTNER 1954₂, Abb. 1). Die übrigen glattwandigen vielporigen *Phlyctochytrium*-Arten bilden mit Ausnahme der parasitischen *Ph. lippsii* (LOHMANN 1942) und *Ph. papillatum* (SPARROW 1952) unter vergleichbaren Bedingungen keine Tubuli, sondern die Papillen sind nackte Gallertpfropfen, welche die Poren der Sporangienwand verschließen. Jedoch ist die Morgensternförmigkeit nicht völlig konstant. Die Entleerungshälsen sind stets vorhanden, wenn der Pilz sich in Rohkultur in einer nicht bakterienfreien Aufschwemmung von Standorterde in Quell- oder Leitungswasser auf eingestreutem Pinuspollen entwickelt. Unter anderen Bedingungen können die Papillen aber auch fehlen.

So hat schon REINOLDT (1951) beobachtet, daß bei Zusatz von wäßrigem Erd- auszug aus der Rhizosphäre von *Rumex acetosus* zum Kulturwasser auf den Pinuspollen Sporangien auftraten, die an Stelle der Papillen gallertartige Pfropfen ausbildeten. Als dann GAERTNER (1954₂) die schwierige Reinkultur des Pilzes gelungen war, stellten sich noch weitere Modifikationen ein. Bei Ausschluß von Bakterien verlor das Sporangium seine morgensternförmige Gestalt, jedoch unter Beibehaltung der Anzahl der Papillen, so daß es eine fast völlig runde Form annahm (GAERTNER 1954₂, Abb.3). Außerdem wurde der Durchmesser des Sporangiums etwas

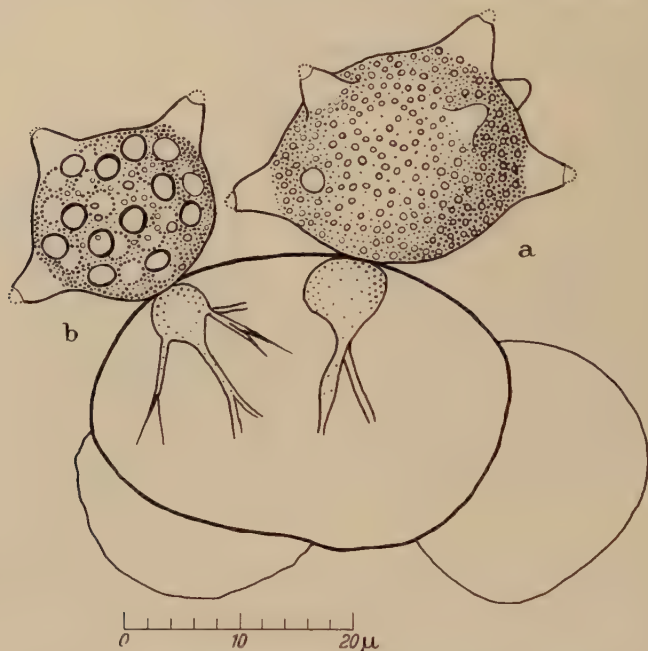


Abb.1. *Phlyctochytrium reinboldtiae* n. sp. Sporangien auf Pinuspollen.
a kurz vor der Reife, b mit fertig ausgebildeten Zoosporen

größer gegenüber dem unter normalen Bedingungen. Der Durchmesser der Papillen an der Basis blieb hingegen konstant, und auch die Größe der Zoosporen schwankte nur in sehr geringen Grenzen.

Noch extremer änderte sich nach GAERTNER das Rhizoidsystem des Pilzes durch die absolute Reinkultur. Während der Pilz in Rohkultur epibiotisch dem Pollenkorn direkt aufsitzt und sein kurzes Rhizoidsystem von einer Apophyse aus in das Pollenkorn hineinwächst (Familienmerkmal der *Phlyctidiaceae*, SPARROW 1943), entwickelte sich das Sporangium in Reinkultur an einem langen, weit verzweigten Rhizoidsystem, das seine Nahrung aus mehreren Pollenkörnern zog, so daß das Sporangium hier interbiotisch gebildet wurde (Familienmerkmal der *Rhizidiaceae*).

Solche morphologischen Änderungen an Chytridineen sind auch sonst schon gelegentlich beobachtet worden. So gibt SPARROW (1943, S. 158) an, daß Größe und Aussehen des Sporangiums, die Zahl der Entleerungsporen sowie das Rhizoidsystem sich nicht immer als konstant erweisen;

und HASKINS (1950) sowie KOCH (1957) fügen noch hinzu, daß auch die Öffnungsweise der Sporangien modifizierbar ist. SCHOLZ (1958₁), der den Einfluß der Salzkonzentration auf Chytridineen untersucht hat, teilt mit, daß sich bei gewissen Arten Gestalt und Durchmesser des Sporangiums bei Variation des Salzgehaltes ändern. SCHOLZ hat unter anderem auch den Reinboldtschen Pilz in Kultur gehabt, er macht aber keinerlei Angaben darüber, daß auch bei ihm der Salzgehalt modifizierend wirkte. SCHOLZ (1958₂) hat eine große Anzahl von Arten und Stämmen auf ihr Verhalten in Salzlösungen verschiedener Zusammensetzung und Konzentration durchuntersucht und dabei charakteristische Unterschiede in der Entwicklung der Pilze gefunden. Das dabei ermittelte Verhalten des Reinboldtschen Pilzes läßt sich natürlich auch mit zur Charakterisierung der Art benutzen. Auf derartige physiologische Unterschiede kann hier aber nicht eingegangen werden.

Da absolute Reinkulturen von Chytridineen meistens sehr große Schwierigkeiten machen (GAERTNER 1954₂), die Vergesellschaftung mit Bakterien den natürlichen Verhältnissen entspricht, und zudem die Entwicklung des Pilzes in den nicht bakterienfreien, im übrigen

Tabelle 1. Unterscheidungsmerkmale von 3 einander sehr ähnlichen *Phlyctochytrium*-Arten

	Sporangien	Apophyse	Papillen	Zoosporen	Geißel	Substrat	Dauersporen
<i>P. lippsii</i>	kugelig-abgeplattet 7–36 μ \varnothing	kann fehlen, 2–4 μ , bisweilen 8–10 μ \varnothing	1–10, meist 1–3	ellipt.-eiförmig, 3–4 μ \varnothing , 1–2 Globuli	25 μ lang	Asosporen versch. dungbew. Pilze	unbekannt
<i>P. papillatum</i>	kugelig, 23–25 μ \varnothing	oval	3–5	kugelig, 4 μ \varnothing , 1 Globul	—	Pollen (parasit.)	27 μ \varnothing , sub- sphaerisch m. zahlr. Papillen
<i>P. reinboldtae</i>	kugelig, abgeplattet, 7–30 μ \varnothing	immer vorhanden, 7–15 μ \varnothing	1–14, meist 3–8	kugel.-birnförmig, 3,5–4 μ \varnothing , 1–7 Globuli	7–18 μ lang	Pollen (saproph.)	unbekannt

aber keinen weiteren Pilz mehr enthaltenden Kulturen auf Pinuspollen immer völlig eindeutig und konstant war, so kann die nachstehende Diagnose für die Bestimmung benutzt werden. Sie stützt sich auf die Angaben REINOLDTS und auf eigene Beobachtungen.

Phlyctochytrium reinboldtae n. sp. Sporangien unter natürlichen Bedingungen ungestielt, kugelig oder abgeplattet, größter Durchmesser 7–30 μ , mit glatter, farbloser, bis zu 0,5 μ dicker Membran und (1) 3–8 (14) kegelförmigen, 3,5–5 μ langen Entleerungshälsen, die von einem hyalinen Gallertpfropfen verschlossen werden. Die kugeligen oder birnförmigen Zoosporen, Durchmesser 3,5–4 μ , mit 1–2 (7) stark lichtbrechenden Globuli, haben eine durchschnittlich 17–18 μ lange Geißel. Sie schwärmen einzeln aus, nachdem sich die Schleimpfropfen in den Tuben aufgelöst haben; Porendurchmesser 2,5–3,5 μ . An der Basis der kugeligen oder leicht abgeplatteten Apophyse (7–15 μ Durchmesser) entspringen 1–3 verzweigte Rhizoide. Die leere Sporangienhülle und Apophyse bleiben lange erhalten. Dauer sporen unbekannt¹.

Phlyctochytrium reinboldtae n. sp. Fungus saprophyticus, sporangiis sessilibus, globosis vel ellipsoideis, 7–30 μ diametro, membrana levi usque ad 0,5 μ crassa sine colore, quae (1) 3–8 (14) tubulos coniformes et 3,5–5 μ longos ferunt. Tubuli massa hyalina concluduntur, quae sporangiis maturescentibus liquescit (dissolvitur). Zoosporae globosae aut piriformes, 3,5–4 μ diametro, 1–2 (7) globulis lucem infragentibus et flagello 17–18 μ longo praeditae sunt et singulae exeunt. Foramina sunt diametro 2,5–3,5 μ . Pars endobiotica constat ex vesicula globosa vel paululum ellipsoidea 7–15 μ diametro, quae subter sporangium tendit et ex 1–3 rhizoideis ramosis. Sporangium vacuum et vesicula diu conservantur. Sporae perdurantes ignotae sunt¹.

Morphologisch sehr ähnlich sind *Phlyctochytrium lippsii* LOHMAN (1942) und *Ph. papillatum* SPARROW (1952). Die Merkmale der drei Arten sind in Tab. 1 einander gegenübergestellt.

Zusammenfassung

Eine schon von REINOLDT beschriebene neue Art von *Phlyctochytrium* wurde wiedergefunden und erhielt den Namen *Phl. reinboldtae*.

Herrn Prof. Dr. R. HARDER danke ich für sein Interesse an der Untersuchung.

Literatur

GAERTNER, A.: Über das Vorkommen einiger niederer Erdphycomyceten in Afrika, Schweden und an einigen mitteleuropäischen Standorten. Arch. Mikrobiol. **21**, 4 (1954). — Einige physiologische und morphologische Beobachtungen an Kulturen niederer Phycomyceten (Rhizophyidium, Phlyctochytrium). Arch. Mikrobiol. **21**, 167 (1954). — HARDER, R.: Über die arktische Vegetation niederer Phycomyceten. Akad. Wiss. Göttingen, Math.-Physik. Klasse, IIb, Biol.-physiol.-chem. Abt. Nr. 1 (1954). — HARDER, R., u. E. UEBELMESSER: Über marine saprophytische Chytridiales und einige andere Pilze vom Meeresboden und Meeresstrand.

¹ Nach brieflicher Mitteilung von W. KOCH (USA) wahrscheinlich vorhanden.

Arch. Mikrobiol. **22**, 87 (1955). — Notiz zur Frage des Vorkommens von Chytridieneen und anderen Pilzen in tiefen Bodenschichten. Arch. Mikrobiol. **26**, 353 (1957). — HARDER, R., u. E. GALLWITZ-UEBELMESSER: Über niedere Phycomyceten Australiens. Arch. Mikrobiol. **32**, 115 (1959). — HASKINS, R. H.: Studies in the lower Chytridiales II. Endooperculum and sexuality in the genus *Diplophlyctis*. Mycologia (N. Y.) **42**, 772 (1950). — KOCH, W. J.: Two new Chytrids in pure culture, *Phlyctochytrium punctatum* and *Phlyctochytrium irregulare*. Jour. Elisha Mitchell Sci. Soc. **73**, 108 (1957). — LOHMAN, M. L.: A new fungus parasite on dung-inhabiting Ascomycetes. Mycologia (N. Y.) **34**, 104 (1942). — REINOLDT, B.: Über die Verteilung einiger niederer Phycomyceten in Erdboden. Arch. Mikrobiol. **16**, 177 (1951). — SCHOLZ, E.: Über morphologische Modifikationen bei niederen Erdphycomyceten und Beschreibung zweier neuer Arten von *Rhizophydium* und *Traustochytrium*. Arch. Mikrobiol. **29**, 354 (1958₁). — Über niedere Phycomyceten aus Salzböden und ihr Verhalten in Salzlösungen. Arch. Mikrobiol. **30**, 119 (1958₂). — SPARROW, F. K.: Aquatic Phycomycetes. Ann Arbor und London 1943. — Phycomycetes from the Douglas Lake Region of Northern Michigan. Mycologia (N. Y.) **44**, 759 (1952).

(Aus dem Institut für landwirtschaftliche Virusforschung der Biologischen Bundesanstalt, Braunschweig)

Spektralphotometrische Untersuchungen am Kartoffel-X-Virus

Von

H. L. PAUL

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. Dezember 1958)

Über das Kartoffel-X-Virus (XV) liegen eine große Anzahl verschiedener Untersuchungen vor, die vor allem biologische Eigenschaften betreffen; die Ultraviolettlichtabsorption des XV ist dagegen seltener geprüft worden. LAVIN, LORING u. STANLEY (1939), BAWDEN u. PIRIE (1940) sowie DORNER u. KNIGHT (1953) haben Absorptionskurven für das native Virus und teilweise auch für seine Bestandteile veröffentlicht, doch fehlen Angaben z. B. über die reine Absorption. Im folgenden sollen die Verhältnisse der Lichtabsorption für das XV unter denselben Bedingungen wie für das TMV (PAUL 1958)¹ dargestellt und Vergleiche gezogen werden.

Material und Methodik

Untersucht wurden die XV-Stämme Fl₄, Bm₅₄, H_{19m}, Cs_{35/50}, M₂₃, T₁₀ und „Ahlhorn“, die aus systemisch erkrankten Blättern von Samsuntabak gewonnen wurden. Die Präparation entsprach derjenigen für das TMV (PAUL 1958), nur daß die Säurefällung bei pH 4,5 ausgeführt oder durch eine Ammonsulfatfällung ersetzt wurde. Außerdem wurde nicht gegen Wasser, sondern gegen Phosphatpuffer bzw. 10/ige NaCl-Lösung dialysiert. Das war notwendig, da salzfreie Virussuspensionen eine starke Trübung aufwiesen und manchmal zum Ausflocken neigten.

Die Untersuchungsmethoden, die Berechnung der reinen Absorption, die Isolierung der Nucleinsäure (NS) und des Proteins, sowie die Bedeutung der Symbole sind früher angegeben worden (PAUL 1958). Als neue Isolierungsmethode für das Protein kam diejenige mit Essigsäure nach FRAENKEL-CONRAT (1957) hinzu.

Ergebnisse

Die spektrale Absorption des nativen XV und die Bestimmung von XV-Konzentrationen

Ein Vergleich der 7 verschiedenen XV-Stämme in Parallelpräparationen brachte keinerlei gesicherte Unterschiede in der Form der Absorptionskurven, so daß auch keine getrennte Behandlung der einzelnen

¹ Berichtigung zu dieser Arbeit: p 309, Legende zu Abb.4: die Zahlen der 1. Spalte in der untersten und zweituntersten Zeile sind miteinander vertauscht worden. Es muß heißen: für 24 Std Aufbewahrung 0,465 und 2,28; für 48 Std Aufbewahrung 0,502 und 1,91.

Stämme notwendig ist. Kurve *a* in Abb. 1 zeigt die Absorption der XV-Suspension in $\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer vom p_H 7,0. Sie wurde aus 15 verschiedenen Präparationen gemittelt. Nach Abzug der Lichtstreuung ergibt sich die Kurve *b*. Für beide sind in Tab. 1 charakteristische Werte zusammengestellt. Im Vergleich zum TMV ist der Betrag der Lichtstreuung beim XV geringer; ferner tritt die Einbuchtung bei 290 $m\mu$, die dem Tryptophan zugeordnet sein dürfte, stets deutlich hervor, während sie bei 280 $m\mu$ wie beim TMV höchstens schwach angedeutet ist. Der Wert $\epsilon_{p\text{rein } 264} = 12300$ liegt niedriger als beim TMV ($\epsilon_{p\text{rein } 266} = 13700$), doch ist der Unterschied nicht ganz gesichert. Der Gehalt an Nucleinsäure läßt sich aus dem Quotienten $E_{\text{rein } 280/260} = 0,838$ zu 6,5–7% errechnen. Das stimmt gut mit den chemischen Analysen überein, die ein N/P-Verhältnis von $26,8 \pm 1$ ergaben, was auf einen NS-Gehalt von 6,25–6,7% schließen läßt. Somit dürfte der NS-Gehalt unserer XV-Stämme etwas größer sein als beim TMV.

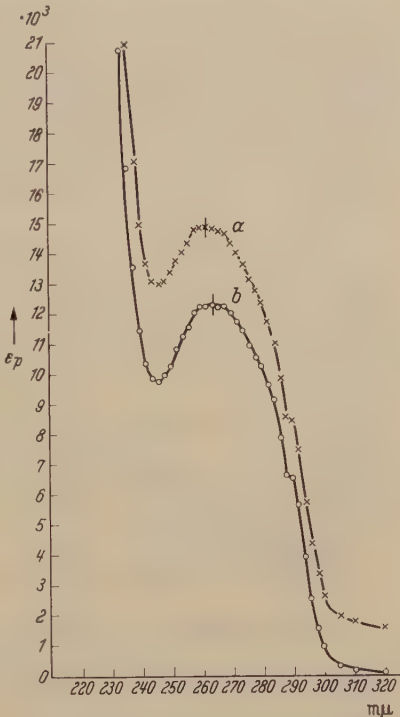


Abb. 1. Absorptionskurven von XV-Suspensionen in $\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer, p_H 7. Kurve *a*: Gesamtabsorption; Kurve *b*: reine Absorption

Tabelle 1. Werte für die UV-Lichtabsorption des nativen XV

	Gesamtabsorption	reine Absorption
Maximum, Lage und Höhe	$\epsilon_{p262} = 14890 \pm 275^*$ $\alpha_{262}^{0,1\%} = 2,97$	$\epsilon_{p\text{rein } 264} = 12310 \pm 250^*$ $\alpha_{\text{rein } 264}^{0,1\%} = 2,45$
Minimum, Lage und Höhe	$\epsilon_{p246} = 12960$	$\epsilon_{p\text{rein } 246} = 9790$
$E_{280/260}$	$0,834 \pm 0,002^*$	0,838
$E_{\text{max/min}}$	1,15	1,26
Exponent der Wellenlänge im Rayleighschen Gesetz	—	3,2

* = mittlerer Fehler.

Berechnet man an Stelle des ϵ_p -Wertes den Absorptionskoeffizienten für die XV-Konzentration, so erhält man $\alpha_{\max}^{0,1\%} = 2,97$ und $\alpha_{\text{rein max}}^{0,1\%} = 2,45$ (für XV/N = 6,06¹). Dem offenbar etwas größeren NS-Gehalt des XV entsprechend, liegt der Wert $\epsilon_{\text{p rein max}}$ etwas niedriger als beim TMV und umgekehrt der Wert $\alpha_{\text{rein max}}$ etwas höher.

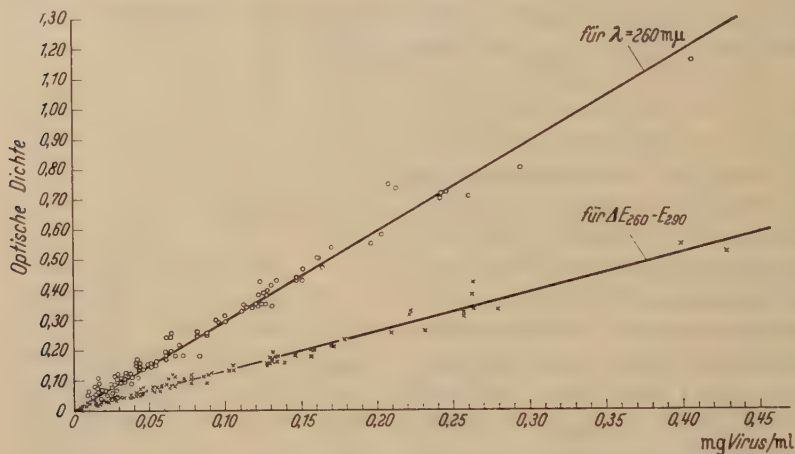


Abb. 2. Die Absorption von nativem XV in Suspensionen verschiedener Konzentration.

Medium: $\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer, pH 7; 1 cm-Cuvetten

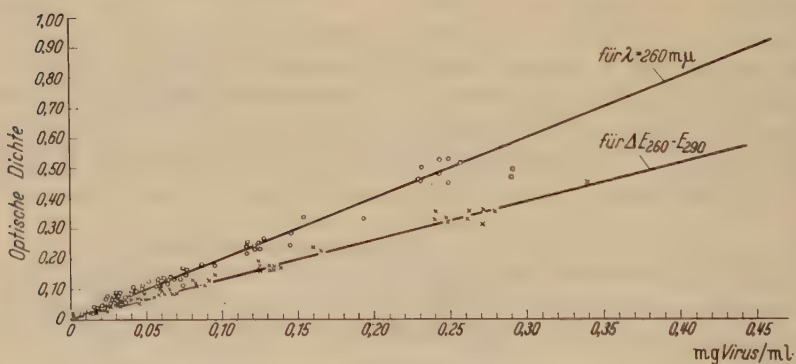


Abb. 3. Die Absorption von XV-Hydrolysaten. Medium: 1 n-HClO₄; 1 cm-Cuvetten

Für quantitative Messungen lassen sich die Geraden der Abb. 2 und 3 gebrauchen. Erstere (Abb. 2) geben die Abhängigkeit der optischen Dichte (Absorption plus Lichtstreuung) von der Konzentration des nativen XV in 1 cm-Cuvetten und $\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer vom pH 7 wieder.

¹ Das Verhältnis XV/N ist hier aus Analogiegründen zum TMV gleich 6,06 gesetzt. Es existieren dafür auch andere Werte, die in der Größenordnung bis 6,20 liegen. Ein Gleiches gilt übrigens auch für das TMV.

Die obere Gerade gilt bei einer Wellenlänge von 260 $m\mu$, die untere für die Differenz der optischen Dichten bei 260 und 290 $m\mu$. Der Fehler der Konzentrationsbestimmungen liegt bei etwa 5%. Zu quantitativen Messungen nach einer Hydrolyse des XV (1 n-HClO₄, 80° C, 30 min, Präcipitat abgeschleudert) lassen sich die Geraden der Abb. 3 verwenden. Die Meßgenauigkeit ist in diesem Falle größer, sie dürfte bei 8% liegen.

Daten für die Nucleinsäure und das Protein des XV

Die mit Phenol isolierte NS besaß sofort nach der Isolierung einen durchschnittlichen ϵ_{p258} von 7600 und einen durchschnittlichen ϵ_{p231} von 3860, sowie für $E_{280/260}$ bzw. $E_{\max/\min}$ Werte von 0,48 bzw. 1,97. Wie aber

Tabelle 2. Die Änderung spektralphotometrischer Daten infolge verschiedener Behandlung der XV-NS

Behandlung	$\epsilon_{p\max}$	$E_{280/260}$	$E_{\max/\min}$
XV-NS, phenolisoliert, sofort vermessen	7595	0,48	1,92
dieselbe XV-NS, nach 24 Std bei Zimmertemperatur	8127	0,47	2,01
dieselbe XV-NS, nach 48 Std bei Zimmertemperatur	8385	0,45	2,04
XV-NS, phenolisoliert, nach 48 Std Dialyse bei 3° C	8396	0,46	2,10
XV-NS, phenolisoliert, mit Ammonsulfat und Alkohol umgefällt, sofort vermessen	8304	0,45	2,18
XV-NS ebenso behandelt nach 24 Std Zimmertemperatur	8971	0,47	2,23
XV-NS, ebenso behandelt nach 24 Std Dialyse bei 3° C	8571	0,44	2,30
XV-NS, phenolisoliert, 30 min bei 80° C in 1 n-HClO ₄ hydrolysiert (in HClO ₄ vermessen)	10000—10500	—	—

auch bei der TMV-NS spielten Vorbehandlung und Alter der Präparation eine Rolle. Deswegen sind in Tab. 2 Daten zusammengestellt, wie sie unter verschiedenen Bedingungen gefunden wurden. Bezogen auf die NS-Konzentration errechnete sich der Absorptionskoeffizient $\alpha_{\max}^{0,1\%}$ zu etwa 23. Abb. 4 zeigt die Absorptionskurve für XV-NS, die mit Phenol isoliert, mit Ammonsulfat und Alkohol umgefällt und dialysiert wurde. Nach einer Hydrolyse mit 1 n-HClO₄ bei 80° C stiegen die ϵ_p -Werte auf etwa 10500 an, das entspricht einer Erhöhung von 15—30%.

Ein Vergleich mit der TMV-NS läßt erkennen, daß die Stärke der Absorption und die Form der Kurve für die NS beider Viren sehr ähnlich sind. Allerdings war bei Gebrauch von Phenol als Trennungsmittel der Quotient $E_{\max/\min}$ der XV-NS häufig kleiner als der der TMV-NS. Erst erneutes Umfällen mit Ammosulfat und Alkohol ließ ihn auf ebenso große Werte wie bei der TMV-NS anwachsen.

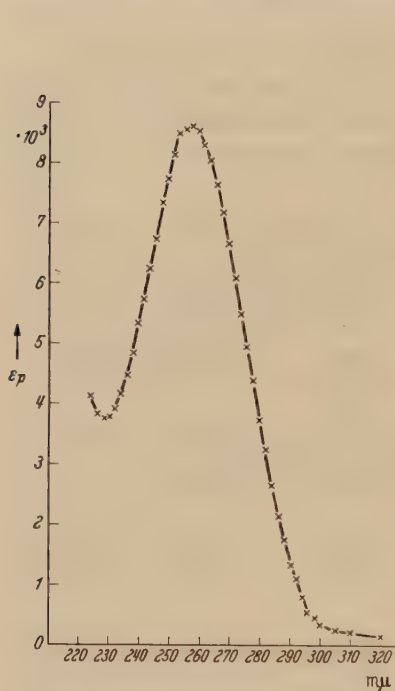


Abb. 4

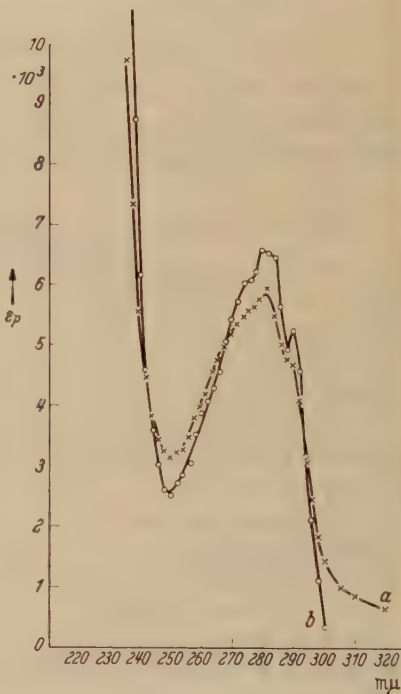


Abb. 5

Abb. 4. Absorptionskurve der XV-NS. Phenolisolation mit Ammonsulfat und Alkohol umgefällt; gemessen in $\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer pH 7

Abb. 5. Vergleich der direkt gemessenen XV-Protein-Absorptionskurve mit der indirekt aus der „reinen Absorption des XV“ und der „XV-NS-Absorption“ ermittelten. Kurve a: gemessene XV-Protein-Absorption: x; Kurve b: errechnete XV-Protein-Absorption: o (Differenz der Kurven aus Abb. 1 (b) und Abb. 4)

Aus den Kurven für die reine Absorption des XV und derjenigen der XV-NS ergibt sich für das XV-Protein der Absorptionskoeffizient $\alpha_{280}^{0,1\%}$ von ungefähr 1,52; direkte Bestimmungen führten zu einem Mittelwert von 1,48. Die Quotienten $E_{\max/\min}$ bzw. $E_{260/280}$ besaßen für Protein, das durch Behandlung mit Säure (HClO_4 in Hitze, wie auch Essigsäure nach FRAENKEL-CONRAT) abgetrennt worden war, eine Größe von 1,88 bzw. 1,44. In Abb. 5 sind die Kurven für die Differenz „ $\epsilon_{p \text{ rein XV}}$ “ minus

„ ε_p XV-NS“ (aus Abb. 1 b und 4) und für den ε_p des isolierten Proteins miteinander verglichen, wobei dieser Wert aus dem Phosphorgehalt des ursprünglichen XV-Präparates errechnet wurde. Beide Kurven stimmen befriedigend überein, allerdings sind die Quotienten der Differenzkurve größer, nämlich 2,64 und 1,73. Auffallend ist in beiden Fällen, besonders aber bei der Differenzkurve, der Knick bei 290 m μ .

Untersuchungen an hydrolytisch gespaltenem XV

Ebenso wie das TMV wurden das XV in 1 n-HClO₄ (30 min bei 80° C) hydrolysiert und das neutralisierte Hydrolysat, sowie das in Alkali gelöste und neutralisierte Proteinsediment spektralphotometriert. Zur Berechnung der ε_p -Werte diente der Phosphorgehalt des nativen Präparates. Die Absorptionskurve für den Proteinanteil wurde bereits besprochen, diejenige für das Hydrolysat stimmt mit der Kuve einer hydrolysierten, phenol-isolierten XV-NS praktisch überein ($\varepsilon_{p\max}$: 10500—11000). Eine Addition der Absorption beider Bestandteile läßt eine XV-Kurve für reine Absorption entstehen, deren Gipfel um die durch die Behandlung mit Säure gesteigerte Absorption der NS erhöht ist.

Diskussion

Spektralphotometrische Messungen für das XV und seine Komponenten scheinen nur von LAVIN, LORING u. STANLEY (1939) vorzuliegen. Die Arbeit von DORNER u. KNIGHT (1953) beschäftigt sich mit Virus-NS, gibt allerdings auch eine Kurve für die Gesamtabsorption des XV an. BAWDEN u. PIRIE (1940) teilen in ihrer Untersuchung über die Inaktivierung von Virus durch Harnstoff nur eine Kurve der optischen Dichte des XV in gepuffertem Harnstoff mit. Die Übereinstimmung der eigenen Meßwerte mit denen der genannten Arbeiten ist für die XV-NS gut, für das XV-Protein dagegen nur teilweise befriedigend. Dies mag an Unterschieden der Präparation und der Stämme liegen. Die ermittelte Kurve der Gesamtabsorption für natives XV stimmte mit der von DORNER u. KNIGHT gezeigten befriedigend überein, nicht dagegen mit der von LAVIN et al. Eine Erklärung der Abweichungen kann nicht gegeben werden. Der Wert des Quotienten $E_{280/260}$ für das native XV wird auch durch die Kurve von BAWDEN u. PIRIE bestätigt.

Für die Absorption des intakten XV ergeben sich, jedenfalls bei den hier benutzten Stämmen, einige Unterschiede zum TMV, obgleich im großen und ganzen die Absorptionskurven recht ähnlich verlaufen. Die XV-Kurve weist bei 290 m μ einen deutlichen Knick auf, der der TMV-Kurve, mindestens in dieser Schärfe, fehlt. Weiterhin war der Betrag der Lichtstreuung bei dem XV geringer als beim TMV. Auf Grund chemischer und spektralphotometrischer Befunde dürfte der NS-Gehalt des XV etwas größer sein als beim TMV.

Daß die Struktur der NS für beide Viren nicht völlig gleich sein kann, liegt auf der Hand. Die Unterschiede scheinen sich aber spektralphotometrisch nicht oder schlecht fassen zu lassen, denn die kleinen Differenzen zwischen den NS-Spektren beider Viren dürften kaum reell sein. Die Verschiedenheit der Proteine hingegen drückt sich klar in der Kurvenform aus.

Werden die Protein- und die NS-Kurven zusammengefügt, so ergibt sich beinahe diejenige der reinen Absorption des intakten XV. Benutzt man statt der Werte für die hochmolekulare NS die Werte der hydrolysierten NS, so bekommt man folgerichtig ein höheres Absorptionsmaximum als es natives XV zeigt. Die Verhältnisse sind somit übersichtlicher als beim TMV, bei dem überraschenderweise keine deutliche Erhöhung der Absorption gefunden worden war.

Zusammenfassung

Mit Hilfe von Reinpräparaten verschiedener Stämme des Kartoffel-X-Virus wurden die Kurven für die gesamte und die reine Absorption ermittelt. Dabei ließen sich zwischen den Stämmen keine Unterschiede in der Lichtabsorption feststellen. Bei $290\text{ m}\mu$ war stets eine deutliche Einbuchtung vorhanden und aus dem Quotienten $E_{\text{rein } 280/260}$ ergab sich ein NS-Gehalt von etwa 6,6%. Chemische Analysen bestätigten diesen Wert. Für Konzentrationsmessungen an nativem und hydrolysiertem X-Virus wurden Eichkurven aufgestellt. Spektralphotometrische Daten für die Nucleinsäure und das Protein, sowie für hydrolysiertes X-Virus wurden angegeben und Vergleiche zu den Ergebnissen beim Tabakmosaik-Virus gezogen.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft ermöglichte die Untersuchung durch Bereitstellen von Geräten; Fräulein H. WOLTERS danke ich für technische Assistenz.

Literatur

BAWDEN, F. C., and N. W. PIRIE: The inactivation of some plant viruses by urea. *Biochem. J.* **34**, 1258—1277 (1940). — DORNER, R. W., and C. A. KNIGHT: The preparation and properties of some plant virus nucleic acids. *J. biol. Chem.* **205**, 959—967 (1953). — FRAENKEL-CONRAT, H.: Degradation of tobacco mosaic virus with acetic acid. *Virology* **4**, 1—4 (1957). — LAVIN, G. I., H. S. LORING and W. M. STANLEY: Ultraviolet absorption spectra of latent mosaic and ring spot viruses and of their nucleic acid and protein components. *J. biol. Chem.* **130**, 259—268 (1939). — PAUL, H. L.: Spektralphotometrische Untersuchungen am Tabakmosaik-Virus. *Arch. Mikrobiol.* **30**, 304—317 (1958).

(Aus dem Botanischen Institut der Universität München)

Die Carotinoide von *Fusarium aquaeductum* Lagh.

Von

WERNER RAU und CLAUD ZEHENDER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Dezember 1958)

Fusarium aquaeductum Lagh. kommt häufig in Flüssen, die mit Abwässern belastet sind, in Massen vor. Der Pilz ist normalerweise weiß bis schwach rosa gefärbt, bildet aber an stark durchlüfteten Stellen (z.B. Streichwehren) kräftig korallenrote Überzüge.

Über die Art und die Zusammensetzung des Pigments von *Fusarium aquaeductum* konnten in der Literatur keine Angaben gefunden werden. CARLILE (1956) untersuchte *Fusarium oxysporum* und fand darin Naphthochinone und Carotinoide. Letztere wurden extrahiert und chromatographiert. Es zeigte sich dabei, daß verschiedene Carotinoide vorhanden sind, die aber nicht weiter identifiziert wurden.

Nach den Untersuchungen von CARLILE werden die Carotinoide nur im Licht gebildet, während Naphthochinone auch in dem im Dunkeln gewachsenen Mycel enthalten sind. Bei anderen Fusarien fanden ASHLEY, HOBBS u. RAISTRICK (1937), ARNSTEIN u. COOK (1947), WEISS u. NORD (1949) sowie RUELIIUS u. GAUHE (1950) verschiedene Naphthochinon-Farbstoffe wie Fusarubin, Javanicin und Solanion.

Eigene orientierende Versuche ergaben, daß der Farbstoff von *Fus. aquaed.* im wesentlichen aus Carotinoiden besteht und nur im Licht und unter Sauerstoff kräftig gebildet wird; Untersuchungen über die Bedingungen der Farbstoffbildung sind im Gange. In der vorliegenden Arbeit soll zunächst nur über die Zusammensetzung des Farbstoffes berichtet werden.

Material und Methode

Fus. aqueduct. wurde aus einem mit Zellstoffabwässern belasteten Fluß reingezüchtet. Von diesen Reinkulturen auf Agarplatten (0,3% Malzextrakt; 1,5% Agar; pH 5,6) wurde der Pilz in Fernbachkolben mit 0,3%iger Malzextraktnährlösung (pH 5,6) eingepflegt und 2—5 Tage bei 22°C und völliger Dunkelheit auf der Schüttelmaschine kultiviert. Die kräftige Pilzsuspension wurde auf einer Nutsche abfiltriert, mehrmals mit aqua dest. ausgewaschen bis das Waschwasser klar war und anschließend in Phosphatpuffer (1/80 mol; pH 5,6) suspendiert.

Zur Farbstoffbildung wurde die Pilzsuspension in Gaswaschflaschen unter ständigem Durchströmen von Luft 2—3 Tage dem Tageslicht und nächtlichem Zusatzlicht von Leuchtstofflampen ausgesetzt. Nach Abnutschen und mehrmaligem Waschen mit aqua dest. wurde der so gewonnene Mycelkuchen im warmen Luftstrom (30—40°C) getrocknet.

Vorversuche ergaben, daß sich der Farbstoff mit Petroläther und Methanol praktisch vollständig extrahieren läßt. Daraus konnte geschlossen werden, daß die Hauptmenge des Farbstoffes aus Carotinoiden und nicht aus Naphthochinonen besteht. Extraktion und Trennung wurden deshalb von vornherein darauf eingestellt.

Das getrocknete Pilzmycel wurde in einer Reibschale mit Quarzsand fein zerrieben und dann entweder mit Petroläther und Methanol oder mit Aceton mehrmals extrahiert. Der Extrakt wurde durch Zentrifugieren geklärt. Nach der Extraktion mit Aceton wurde der Farbstoff durch Zugabe von Wasser in Petroläther übergetrieben, anschließend sofort in Epi- und Hypophase getrennt oder nach Zugabe von 12%iger methanolischer KOH etwa 8 Std unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührer verseift. Um eine Zersetzung des Farbstoffes weitgehend zu vermeiden, wurde die Verseifung im Dunkeln und unter Stickstoff vorgenommen.

Die Trennung von Epi- und Hypophase und deren Reinigung erfolgte nach den Angaben von KARRER u. JUCKER (1948).

Weder die Art der Extraktion, noch die Verseifung hatte auf die chromatographische Trennung und auf die Absorptionsspektren der Farbstoffe einen Einfluß.

Für die Säulenchromatographie der Epiphase erwiesen sich Ca(OH)_2 als Adsorbens und Benzol als Entwickler als geeignet; die Hypophase wurde an einer CaCO_3 -Säule mit Benzol aufgetrennt. Die verschiedenen Farbstoffzonen wurden ausgestochen und mit einem Benzol-Methanol-Gemisch eluiert, die Lösung durch Zentrifugieren geklärt und unter vermindertem Druck in Stickstoffatmosphäre getrocknet. Anschließend wurden die Farbstoffe in geeigneten Lösungsmitteln aufgenommen und ihr Absorptionsspektrum mit einem Beckman-Spektralphotometer Modell B gemessen; die genauere Messung der Absorptionsmaxima von 1 zu 1 $\mu\mu$ erfolgte im Modell DU.

Ergebnisse

Epiphase

Bei der Auftrennung an der Ca(OH)_2 -Säule zeigten sich 7 gefärbte Zonen, die durch mehr oder weniger breite farblose Zwischenzonen getrennt waren. In Abb. 1 ist die Verteilung der Farbstoffe auf einem typischen Chromatogramm dargestellt. Die in der Abb. 1 als E 4a bezeichnete Zone konnte nur bei einem Versuch mit sehr viel Material gefunden werden. Alle übrigen Pigmente traten bei mehrmaliger Wiederholung immer auf. Die Lage der Absorptionsmaxima differierte von Versuch zu Versuch teilweise um 1—2 $\mu\mu$; die angegebenen Maxima sind Mittelwerte aus sämtlichen Messungen. In der Tabelle sind Farbe, Menge und Absorptionsmaxima in Petroläther und Schwefelkohlenstoff der epiphasischen Pigmente zusammengestellt.

Der Farbstoff E 1 war in jedem Chromatogramm nur in so geringer Menge vorhanden, daß sein Absorptionsspektrum erst nach Vereinigung der Eluate aus mehreren Versuchen gemessen werden konnte. Danach, sowie nach dem chromatographischen Verhalten und der Form der Absorptionskurve dürfte es sich sehr wahrscheinlich um Rhodoxanthin handeln. Allerdings zeigt Rhodoxanthin bei der Verteilungsprobe eine gleichmäßige Aufteilung in Epi- und Hypophase. Eine mit E 1 durch-

geführte Verteilungsprobe war nicht eindeutig; auch konnte in der Hypophase kein Farbstoff mit gleichem Absorptionsverhalten gefunden werden. Beides könnte jedoch auf die sehr geringe Farbstoffmenge zurückzuführen sein.

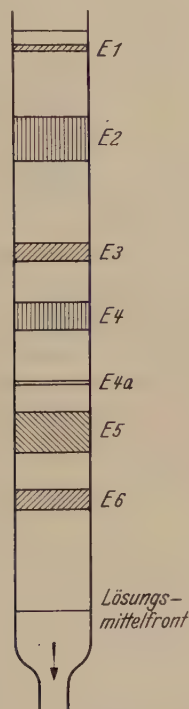


Abb. 1. Verteilung der epiphasischen Carotinoide an einer $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Säule; Entwickler Benzol

E 2 ist nach der Lage seiner Absorptionsmaxima Lycopin. Die Literaturangaben über die Absorption von Lycopin weichen erheblich voneinander ab; mit den neueren Meßwerten von GOODWIN and LAND (1956), SCHLEGEL (1958) und ENGEL u. FRIEDERICHSEN (1958) stimmen aber die Maxima von E 2 befriedigend überein. Die Form der

Tabelle. *Epiphasische Carotinoide von Fusarium aquaeductum*.
Pigmente in der Reihenfolge abnehmender Adsorption. (~ bedeutet Verflachung der Kurve)

Pigment	Farbe	Menge	Abs.-Maxima in Petroläther	Abs.-Maxima in CS_2	Identifiziert als
E 1	violett	+	459—60; 488; 522	496—97; 527—28; 562	Rhodoxanthin
E 2	lachsrot	+	441—42; 468; 499	478; 505; 541	Lycopin
E 3	bläulich-rot	+	456—57; 479—80; 510—11	~496; 518; ~547—50	?
E 4	bräunlich-lachsrot	+	~443—49; 467—68; 497	476; 503; 535—37	Neolycopin?
E 4 a	lachs-gelb	(+)	439; 465	473—74; 501	Poly-cislycopin II
E 5	orange	+	433; 456; 487	~466—68; 494; 527	γ -Carotin
E 6	grüngelb	+	330; 393; 418—19; 448; ~476—80	386; 420; 450; 489; ~520	?

Absorptionskurve von E 2 mit einem sehr hohen langwelligen Maximum spricht ebenfalls für eine Identität mit Lycopin.

E 3 konnte mit keinem bekannten Farbstoff sicher identifiziert werden. Seine Absorptionskurve in Petroläther zeigt Abb. 2. Nach seinen Absorptionsmaxima könnte es sich vielleicht um das von GOODWIN u. LAND (1956) in *Chromatium* aufgefundene neue Pigment P 481 handeln,

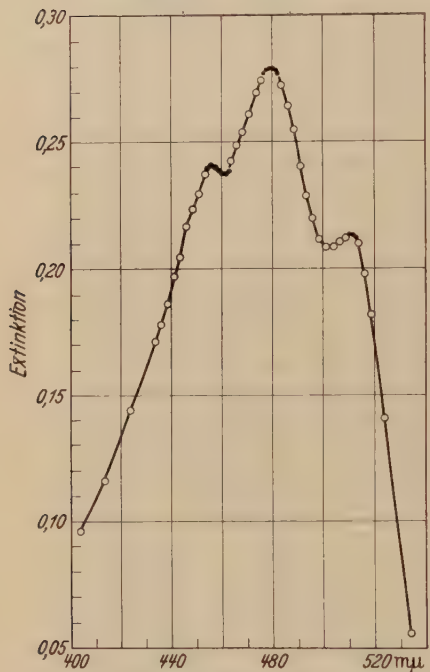


Abb. 2. Absorptionsspektrum von E 3 in Petroläther (30–50° C)

das folgende Maxima besitzt: in Petroläther 454, 481, 514, in Schwefelkohlenstoff 492, 520, 558 (in mμ). Da aber P 481 langsamer als Lycopin an der Säule läuft, während E 3 schneller als Lycopin (E 2) wandert, ist die Identität fraglich.

E 4 zeigt im wesentlichen dieselben Absorptionsmaxima wie E 2, mit dem Unterschied, daß die beiden Nebenmaxima sehr wenig ausgeprägt und oft nur noch als Schultern (Verflachungen der Kurve) vorhanden sind. Das Hauptmaximum und die vorhandenen Nebenmaxima sind gegenüber E 2 etwas zum Kurzwelligen verschoben. Danach könnte es sich um ein Isomeres des Lycopins, möglicherweise um Neolycopin handeln. Auch die Ähnlichkeit der Farbe und die Tatsache, daß es an der Säule schneller läuft als E 2, deuten auf ein Isomeres, vielleicht auch auf ein Abbauprodukt des Lycopins hin. Eine sichere Identifizierung ist aber nicht möglich.

Bei E 4a, das nur einmal gefunden wurde, dürfte es sich um Poly-cis-Lycopin II handeln.

E 5 ist mit γ -Carotin identisch. Die Verschiebung der Maxima zum Kurzwelligen beruht wohl auf einer teilweisen cis-Isomerisierung; dafür spricht, daß in CS₂ ein schwacher Cispipfel gefunden wurde.

Das Absorptionsspektrum von E 6 war zwar bei jedem Versuch gleich (siehe Abb. 3), trotzdem dürfte es sich um ein Gemisch aus verschiedenen Komponenten handeln, da die Kurve keine Ähnlichkeit mit der irgendeines bekannten Stoffes hat. Eine weitere Auftrennung war bis jetzt nicht möglich.

Hypophase

Die hypophasischen Farbstoffe ließen sich aus 90%igem Methanol nur dann vollständig in Äther übertreiben, wenn mit Essigsäure ange-

säuert wurde. Es handelt sich demnach um saure Pigmente. Die ätherische Lösung konnte nicht mit Natriumsulfat getrocknet werden, da das Pigment von diesem adsorbiert wurde. Getrocknet wurde deshalb durch mehrmaliges Eindampfen unter vermindertem Druck im Stickstoffstrom.

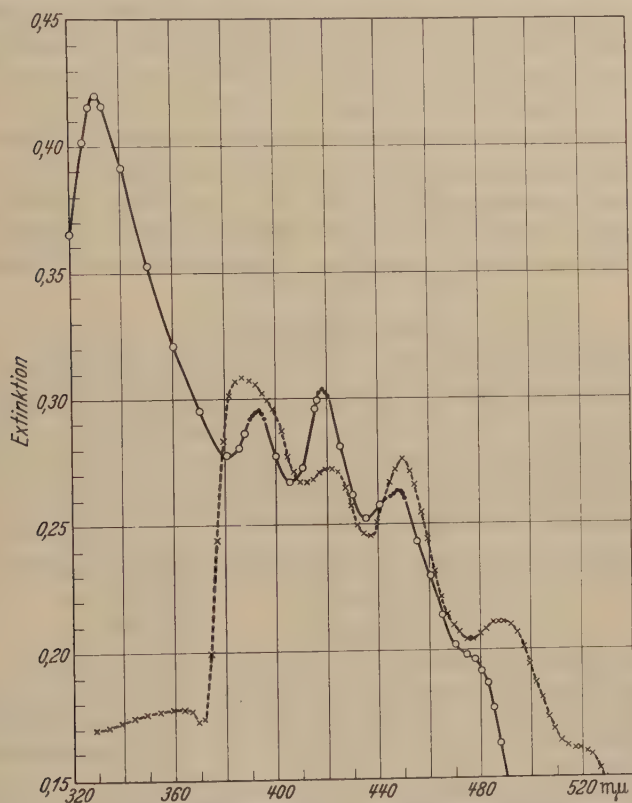


Abb. 3. Absorptionsspektren von E 6; O in Petroläther; + CS₂

Bei der Auftrennung an der Säule wanderte die Hauptmenge des Farbstoffes nur wenig, während sich nach unten 3 weitere schwach gefärbte Zonen abgliederten. Die Farbe war bei allen 4 Farbstoffen lachsgelb bis gelb. Die Hauptfraktion hatte folgende Absorptionsmaxima: in Petroläther (30–50° C) ~448–52, 471, ~500–02; in Schwefelkohlenstoff ~477–78, 514, ~542–45; in Benzol ~453–58, 488, ~516–20; in Methanol 438–40, 463, 493–94 (~ bedeutet Verflachung der Kurve). Nach der Lage derselben, nach der Form der Absorptionskurven und nach dem übrigen Verhalten handelt es sich um den von ZALOKAR (1957) in *Neurospora crassa* aufgefundenen sauren Farbstoff Neurosporaxanthin, der folgende Absorptionsmaxima zeigt: in Hexan 472; in Benzol 486; in alkalischem Methanol 464 mμ.

Die Messung der 3 schneller laufenden Fraktionen ergab im sichtbaren Bereich sehr abgeflachte Absorptionskurven mit denselben Maxima wie die Hauptfraktion; die Maxima waren aber um so flacher und undeutlicher, je schneller der Farbstoff an der Säule lief. Dafür trat ein neues, sehr steiles Maximum — in CS_2 bei $381 \text{ m}\mu$ — auf. Blieb der Hauptfarbstoff längere Zeit im Licht stehen, so zeigte er dasselbe Absorptionsverhalten. Die 3 schneller laufenden Fraktionen der Hypophase sind demnach Abbauprodukte des Neurosporaxanthins. ZALOKAR gibt an, daß er bei der Chromatographie des Neurosporaxanthins eine schneller laufende gelbe Fraktion erhielt, die im sichtbaren Bereich ein unregelmäßiges Absorptionsspektrum zeigte. Die Ausbildung eines neuen Maximums wird von ihm nicht erwähnt. Dagegen fanden FRIEDERICHSEN u. ENGEL (1957) bei einem Pigment aus *Sphaerobolus* diese Erscheinung.

Zusammenfassung

Die im Licht auftretende Färbung von *Fusarium aquaeductuum* ist hauptsächlich auf den Gehalt an Lycopin, γ -Carotin und Neurosporaxanthin zurückzuführen. Daneben treten in geringerer Menge ein nicht sicher zu identifizierendes Isomeres des Lycopins, Poly-cis-Lycopin II und Rhodoxanthin auf. Außerdem wurde ein epiphasisches Carotinoid gefunden, das nicht identifiziert werden konnte.

Die Arbeit wurde von der Wasser- und Abwasserforschungsstelle der Zellchemie unterstützt.

Literatur

- ARNSTEIN, H. R. V., and A. H. COOK: Production of antibiotics by fungi Part III. Javanicin an antibacterial pigment from *Fusarium javanicum*. J. chem. Soc. 1021 (1947). — ASHLEY, J. N., B. C. HOBBS and H. RAISTRICK: LV. Studies in the biochemistry of micro-organisms. LIII. The crystalline colouring matters of *Fusarium culmorum* (W. G. Smith) Sacc. and related forms. Biochem. J. **31**, 385 (1937). — CARLILE, M. J.: A study of the factors influencing non-genetic variation in a strain of *Fusarium oxysporum*. J. gen. Microbiol. **14**, 643 (1956). — ENGEL, H., u. I. FRIEDERICHSEN: Die Carotinoide von *Mutinus caninus* Huds. Arch. Mikrobiol. **31**, 28 (1958). — FRIEDERICHSEN, I., u. H. ENGEL: Beiträge zur Kenntnis des Abschußrhythmus und des Farbstoffs von *Sphaerobolus stellatus* (Thode) Pers. Planta **49**, 578 (1957). — GOODWIN, T. W.: Carotenoids, in: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse III, 272 (1955). — GOODWIN, T. W., and D. G. LAND: The carotenoids of photosynthetic bacteria. I. The nature of the carotenoid-pigments in a halophilic photosynthetic sulphur bacterium (*Chromatium* spp.). Arch. Mikrobiol. **24**, 305 (1956). — KARRER, P., u. E. JUCKER: Carotinoide. Basel: Verlag Birkhäuser. 1948. — RUELIUS, H. W., u. A. GAUHE: Über Fusarubin, einen Naphthochinonfarbstoff aus Fusarien. Justus Liebigs Ann. Chem. **569**, 38 (1950). — SCHLEGEL, H. G.: Myxoxanthophyll als Hauptcarotinoid von *Mycobacterium phlei*. Arch. Mikrobiol. **31**, 231 (1958). — WEISS, S., and F. F. NORD: On the mechanism of enzyme action. XXXVII. Solanone, a pigment from *Fusarium solani* D² Purple. Arch. Biochem. **22**, 288 (1949). — ZALOKAR, M.: Isolation of an acidic pigment in *Neurospora*. Arch. Biochem. **70**, 568 (1957).

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen)

Kleine Mitteilungen über Flagellaten und Algen

V. *Gonium quadratum* nov. sp.*

Von

E. G. PRINGSHEIM

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. Dezember 1958)

I. Herkunft und Züchtung

Das neue *Gonium* stammt von einem Gartenbeet in Klausen, Südtirol, welches lange nicht gedüngt worden war. Ende Juni 1957 war eine Erdprobe entnommen worden. Am 3. 7. wurden davon Kulturen angelegt, nämlich a) eine abgekochte Erbse in kleinem Glaszylinder mit der Erde und Wasser bedeckt; b) etwas von der Probe in ein Reagensglas mit einem halben Erbsenkeimblatt und darüber Lehmerde und Wasser, das im Dampftopf pasteurisiert worden war. Beide Kulturen wurden im Dunkeln gehalten.

Am 20. 7., also nach wenig mehr als 2 Wochen, traten in beiden Kulturen *Gonium*-Coenobien auf. Die Reagensglaskultur war unten grau von Schwefeleisen, die Flüssigkeit erschien blaß grünlich. Unter dem Mikroskop sah man sehr bewegliche, schwach gefärbte, ungefähr quadratische Kolonien, deren Zellen viele Stärkekörnchen enthielten. Besonders in der Zylinderkultur schwammen die Gonien noch nach vielen Wochen im Dunkeln umher¹.

Es ist ein seltener Fall, daß man in dunkel gehaltenen Anreicherungskulturen chlorophyllhaltige Flagellaten antrifft. *Chlorogonium* (PRINGSHEIM 1937, S. 653) war unter ähnlichen Umständen ziemlich häufig aufgetreten, ohne daß aber sicher ist, daß damals das Licht völlig ausgeschlossen war. Sonst war mir das nur bei *Euglena gracilis* begegnet. Es handelt sich also bei diesem *Gonium* um eine heterotroph gedeihende Art, während die bekannten Arten der Gattung, z. B. *G. pectorale* und *G. sociale* keine Neigung zur Heterotrophie zeigen. Wie sich später zeigte (unveröffentlicht), verhält sich aber *G. octonarium* Pocock ähnlich. Unter den übrigen Volvocaceen scheint keine im Dunkeln zur Vermehrung zu bringen zu sein.

Die neue Art, die ich *Gonium quadratum* nennen möchte, war am Licht wie im Dunkeln leicht weiterzukultivieren. Über ihre Reinzüchtung und

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

¹ Da keine sexuelle Fortpflanzung beobachtet wurde, lag Verdacht auf Heterothallie vor. Um möglicherweise das andere Geschlecht zu finden, wurden im Oktober 1958 von der gleichen Stelle Erdproben entnommen, aber *Gonium* trat nicht auf.

ihre Ernährungsansprüche wird bei anderer Gelegenheit im Zusammenhang mit den übrigen Volvocaceen berichtet werden. Für morphologische Zwecke genügte die Erdefaulkultur mit Graupenkörnern oder noch besser Erbsenvierteln unter Lehmerde. Von mehrmals gewaschenen Kolonien bekam man nach einer Woche schon ganz schöne Kulturen, im Dunkeln fast wie am Licht. Nach 2 Wochen waren die Kulturen dicht erfüllt von den beweglichen Organismen, wobei aber die Kolonien bald anfangen, sich in Einzelzellen aufzulösen. In mineralischen Nährlösungen erfolgt keine, bei Zusatz von Erdabkochung nur schwache Vermehrung.

Beim Übergießen der eingesammelten Erde mit dest. Wasser oder mineralischer Nährlösung erfolgte bei *G. quadratum*, wie auch bei anderen Volvocaceen, keine Vermehrung. Dies scheint die von Pocock (1955) und anderen Forschern benutzte Methode gewesen zu sein. Mit Getreidekörnern oder Erbsenstückchen oder Beschickung von pasteurisierten Erde-Faulröhrchen mit kleinen Mengen der Erdprobe erhält man bessere Ergebnisse. Auch die Fortzüchtung in Erde-Wasser, selbst mit mineralischen Nährlösungen, gelang mir nicht.

II. Morphologie

Die Kolonien von *G. quadratum* haben meist 8 Zellen; aber auch 4- und 16zellige Kolonien kommen vor. Je günstiger die Vermehrungsbedingungen, um so mehr Kolonien mit 16 Zellen treten auf. Mit Erbsenvierteln und in Reinkulturen sind sie bei guter Beleuchtung häufig; mit Graupenkörnern, mit Stärke und Ammoniummagnesiumphosphat, und mit Erbsenvierteln unter Sand bekommt man nur 8zellige Kolonien, obgleich gute Vermehrung stattfindet. Kolonien mit 16 Zellen sind nie in der Mehrzahl. 4zellige Kolonien finden sich vereinzelt zwischen den anderen. Beim Zerfall der Kolonien in alten Kulturen entstehen unregelmäßige Zellgruppen und Einzelzellen. Es entstehen also nicht etwa 4zellige aus 8zelligen und 8zellige aus 16zelligen Kolonien durch Zerfall, sondern die Zahl der Zellen einer Kolonie hängt davon ab, in wieviel Tochterzellen der Protoplast der Mutterzelle sich teilt. Das wieder scheint davon abzuhängen, wie stark diese an Volumen zunehmen, bevor sie sich zur vegetativen Vermehrung anschicken, bei der fertige kleine Tochterkolonien in je einer Mutterzelle entstehen, ausschlüpfen und bis zu einer gewissen Größe heranwachsen, bevor sie wieder Tochterkolonien bilden.

Die ungefähr quadratische Gestalt der für die neue Art normalen 8zelligen Kolonien kommt dadurch zustande, daß 4 sich in der Mitte nähernde Zellen etwas längliche Gestalt besitzen und kreuzartig angeordnet sind, während die anderen 4 Zellen nach innen breit kegelförmig sind und die Zwischenräume einnehmen (Abb. 1). Bei den 4zelligen Kolonien sind nur die kreuzförmig gestellten Zellen vorhanden, aber etwas breiter ausgebildet (Abb. 2a, b). Die 16zelligen Kolonien können im

Umriß fast kreisförmig, aber auch angedeutet rhombisch sein (Abb. 3a, b). Das innere Kreuz ist noch erkennbar, seine Zellen aber mehr rundlich, fast wie bei den 4 zelligen Kolonien. Es ist umgeben von einem Kranz meist ungefähr gleichgroßer, ungefähr ei- bis birnenförmiger Zellen, durch die gerundete Außenbegrenzung der Kolonie entsteht.

Die vier inneren Zellen sind einander nicht gleich. Zwei von ihnen sind innen dem Zentrum genähert und berühren sich bei-

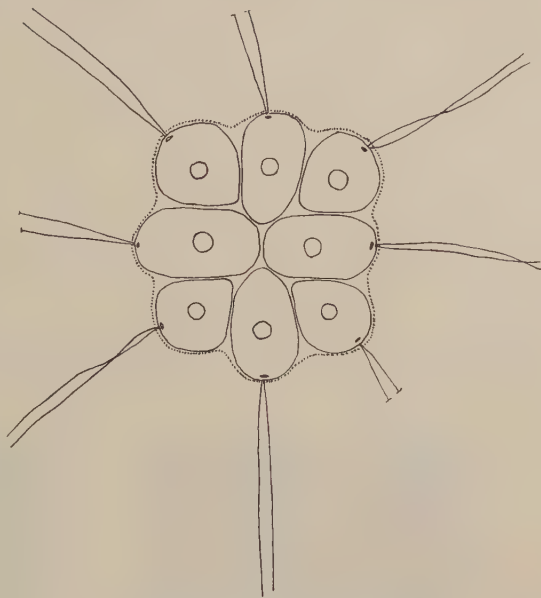


Abb. 1. Typische 8 zellige Kolonie. Eingezeichnet sind: Pyrenoide, Augenflecke und die nicht ohne Tusche sichtbare Gallerthülle. Zu beachten: Kreuz aus ungleichen Zellpaaren, Verschiedenheit der Zellformen, Länge der Geißeln. 1200 mal

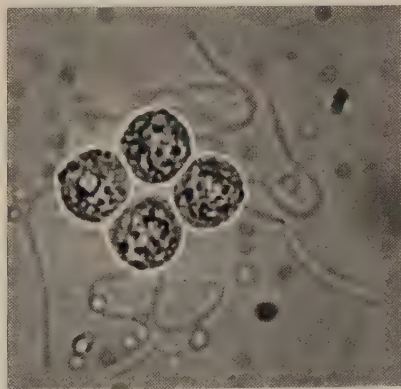
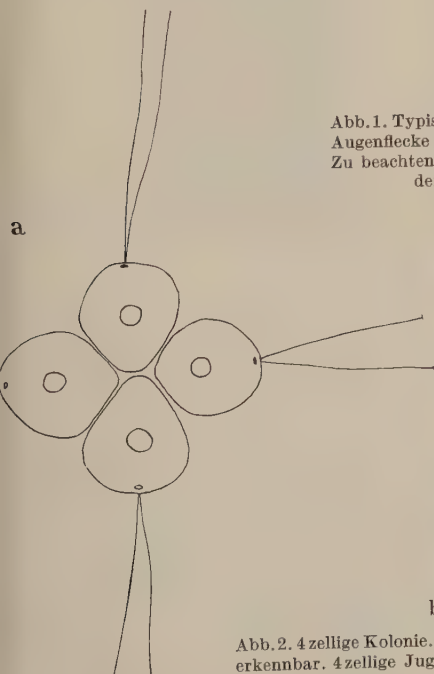


Abb. 2. 4 zellige Kolonie. Die Verschiedenheit der beiden Zellpaare ist auch hier erkennbar. 4 zellige Jugendstadien sehen ähnlich aus. a 1200 mal; b 500 mal

nahe. Sie können fast zylindrisch sein und bestimmen die Lage der Achse 1 (Abb. 1). Die anderen beiden liegen in einem etwas größeren Abstand auf

der Achse 2 und sind gewöhnlich mehr eiförmig. Die Verschiedenheit der beiden Achsen ist auch bei 4- und 16zelligen Kolonien erkennbar

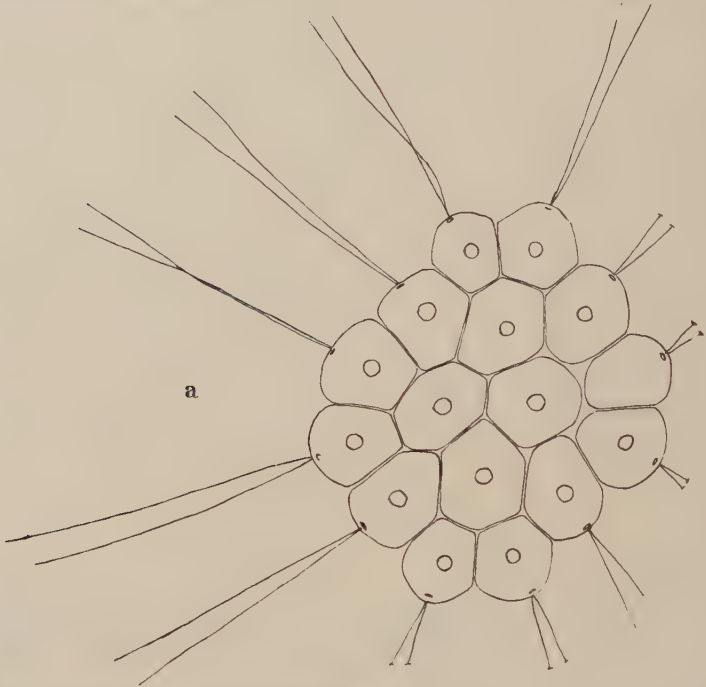
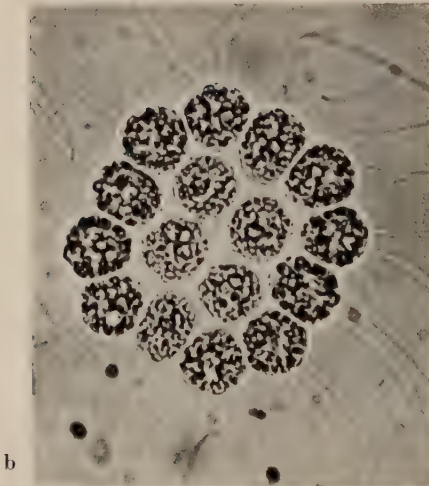


Abb. 3. 16zellige Kolonie. In der Mitte das 4 zellige Kreuz, dessen Zellen weder Augenflecke noch Geißeln haben. a 1200mal; b 500mal



(Abb. 3), kann aber bei 8zelligen zuweilen fast verwischt sein, indem die Zellen von der Mitte abrücken und einen zentralen Raum freigeben (Abb. 4a, b). Die quadratische Gestalt der 8zelligen Kolonie bleibt dabei erhalten. Bei allen diesen Angaben ist an die Projektion der schwach kalottenförmigen, etwas gewölbten Kolonie in die Bildebene gedacht.

Die Coenobien von *G. quadratum* sind von einem Schleimmantel umgeben, der schwer erkennbar ist, aber mit Tusche sichtbar gemacht werden kann (Abb. 5a, b), und der von den Geißeln durchsetzt wird.

Methylenblau färbt ihn nicht, wohl aber die Zellwände und die Zwischensubstanz, die die inneren Zellwände verbindet.

Die 8zelligen Kolonien haben eine Seitenlänge von 25 bis 50 μ . Die 16zelligen sind nicht viel größer. Ihr größter Durchmesser kann aber mehr

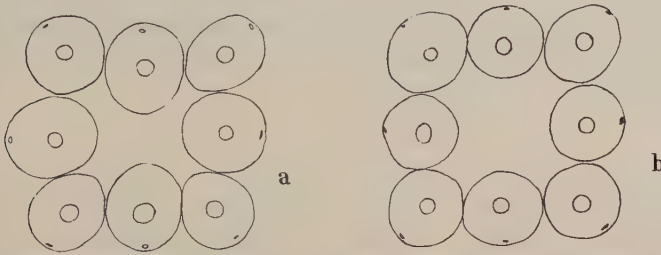


Abb. 4. 8zellige Kolonien mit auseinander gerückten Zellen, welche die Mitte frei lassen. Die quadratische Gestalt der Kolonien bleibt erhalten. Bei a ist die Verschiedenheit der Zellpaare noch erkennbar. 1200 mal

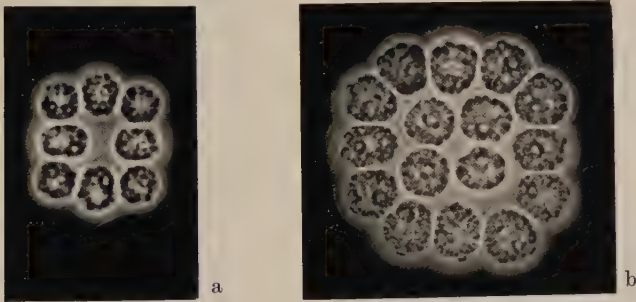


Abb. 5. 8- und 16zellige Kolonien von *Gonium quadratum* in Tusche. Die Zellen sind etwas weiter auseinander gerückt als bei den Zeichnungen. 500 mal

als 60 μ betragen. Ihre Zellen pflegen kleiner zu sein als die der 8zelligen Kolonien. Alle Kolonien sind in erwachsenem Zustand nur sehr schwach gewölbt.

Die Zellen von *G. quadratum* sind meist ei- bis birnenförmig. Die zwei inneren, zusammenstoßenden Zellen der typischen 8zelligen Kolonien sind fast zylindrisch (wurstförmig), die äußeren 4 nahezu herzförmig. Ihre Länge beträgt 10–15 μ . Alle Zellen besitzen je ein Pyrenoid. Ihre Augenflecke liegen alle nach außen, nahe dem Geißelansatz, am vordersten Rande des topfförmigen Chromatophoren, scheinen aber den inneren Zellen der 16zelligen Kolonien von *G. quadratum* zu fehlen, während sie bei *G. pectorale* and *G. multicoecum* in allen Zellen vorhanden sind.

Die Geißeln, die sich auf dem Objektträger nach OsO_4 -Fixierung mit Methylenblau färben lassen, sind bei *G. quadratum* 2–3 mal so lang wie die Zellen.

Wenn Einzelzellen auftreten, so brauchen diese nicht krankhaft verändert zu sein. Sie sehen z. B. im Kondenswasser von Bakterienagar wie ein *Chlamydomonas* aus (Abb. 6). Sie sind eiförmig, wobei am spitzen Ende, wo die langen Geißeln ansitzen, die Andeutung einer Papille zu sehen ist. Das Chromatophor ist schüsselförmig, mit dem Pyrenoid im verdickten Basalteil. Der Kern liegt davor, das Stigma wieder im vordersten Teil des Chromatophors. Die Geißeln sind länger als bei den meisten Arten von *Chlamydomonas*.

III. Vergleich mit anderen Arten

Bei *Gonium octonarium* Pocock, der anderen meist 8zelligen Art, ist der Umriß der Kolonien nicht viereckig, sondern annähernd kreisförmig

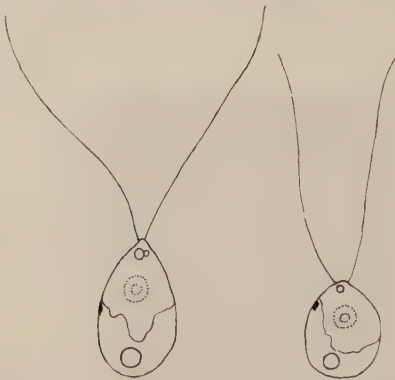


Abb. 6. Zwei Einzelzellen, die einem *Chlamydomonas* gleichen. Außer Chromatophoren, pulsierenden Vacuolen, Augenflecken und Pyrenoiden sind hier auch die Zellkerne eingezeichnet. 1200mal

(Abb. 7 c). In den meisten Fällen sind aber auch hier die zwei Achsen ganz deutlich, indem zwei Zellen in der Mitte nahe beieinander liegen, während die mit ihnen gekreuzten mit den 4 übrigen Zellen einen äußeren Kranz bilden. Derselbe Unterschied ist von SCHREIBER (1925) bei 4zelligen Kolonien von *G. pectorale* abgebildet worden. Diese Zeichnung wurde übernommen von PASCHER (1927, S. 416, Fig. 379 a), IYENGAR (1951, S. 57, Fig. E) und FRITSCH (1935, S. 118, Fig. F). Meines Wissens hat keiner der Autoren diese Verschiedenheit

der Zellen des inneren Kreuzes im Text erwähnt außer PASCHER (1927, S. 416). Sie scheint mir aber bemerkenswert, da sie sich bei vielen Volvocaceen findet, wie aus den Abbildungen zu ersehen ist. POCKOCK stellt sie (1933, Fig. 5 I) für *Volvox* und (1955, Fig. 22) für *Gonium multicoccum* zeichnerisch und (1955, Fig. 26—30) photographisch dar. Sie bildet dasselbe für 4zellige Kolonien von *Gonium octonarium* (1958, Fig. 3) und für die Gametenbildung ab (Fig. 6). Für *Astrophoneme* ist es von J. R. STEIN (1958, Fig. 20 und 22) wiedergegeben worden, und zwar für junge Kolonien mit 4 und 8 Zellen in der Ansicht von oben.

In jungen, vor allem in 4zelligen Stadien ist der Unterschied der Achsen besonders deutlich, immer in der Weise, daß zwei Zellen sich in der Mitte berühren, die dazu senkrechten jedoch nicht. Es müssen immer zwei ungleiche Zellen aus einer Mutterzelle hervorgegangen sein.

Später übernimmt die Entwicklung der 8 zelligen Kolonien von *G. quadratum* einen anderen Verlauf als bei den gleichzähligen Kolonien von *G. octonarium*. Bei letzterer sind die Teilungsebenen der Zellen alle gleichgerichtet, wodurch drei parallele Zellreihen entstehen, eine mittlere zu 4 und auf ihren beiden Seiten je eine Reihe zu 2 Zellen. Die inneren zwei Zellen der mittleren Reihe, die also nicht Schwesterzellen sind, bleiben an Größe etwas zurück und bilden die Tochterzellen später als die 6 äußeren Zellen.

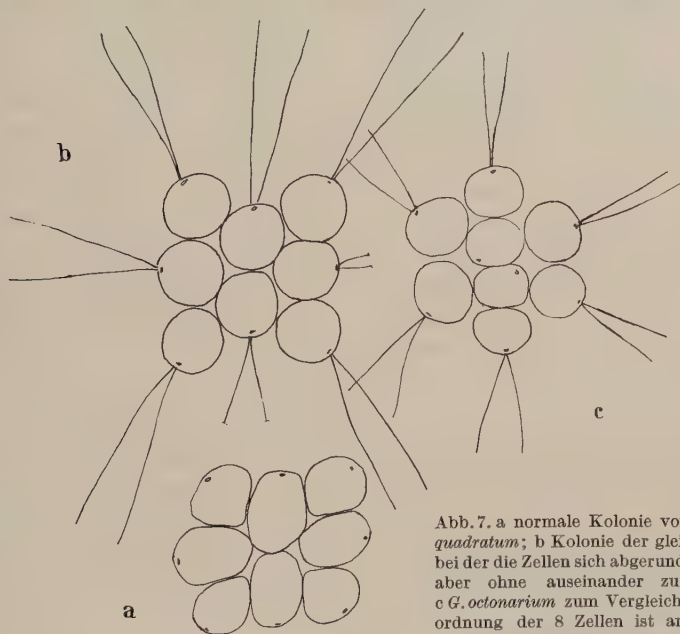


Abb. 7. a normale Kolonie von *Gonium quadratum*; b Kolonie der gleichen Art, bei der die Zellen sich abgerundet haben, aber ohne auseinander zu rücken. c *G. octonarium* zum Vergleich: die Anordnung der 8 Zellen ist anders, die Geißeln sind kürzer. 1200 mal

Bei *G. quadratum* sind die Teilungsschnitte, die aus den 4 Zellen 8 machen, radiär, also Längsteilungen in bezug auf die durch den Geißelpol bestimmte Längsachse der Zellen. Je eine der 4 Tochterzellen bleibt am Ort, so daß wieder das Kreuz entsteht, die anderen füllen den Winkel zwischen den Kreuzbalken aus. Niemals kommt eine Zellanordnung wie bei *G. octonarium* mit zwei inneren und 6 äußeren Zellen zustande. Auch wenn die Zellen abgerundet sind, wie bei *G. octonarium*, ist die Anordnung doch ganz anders (Abb. 7a, b). Auch bei den 16 zelligen Kolonien von *G. quadratum*, die bei *G. octonarium* nicht gebildet werden, ist das Kreuz zu erkennen. Es kommt aber eine nicht mehr quadratische, sondern eine fast kreisrunde Kolonie zustande. Die einzelnen Teilungsschritte wurden nicht verfolgt. Bei den 16 zelligen Kolonien von *G. multicoccum* ist die Anordnung ähnlich. Das Kreuz ist ebenfalls bis zuletzt erkennbar, desgleichen bei den üblichen 32 zelligen Kolonien.

G. quadratum steht überhaupt *G. multicoccum* näher als *G. octonarium*. Selbst die 16zelligen Kolonien können aber nicht verwechselt werden, denn *G. multicoccum* hat abgerundete Zellen (vgl. Pocock 1955, Fig. 16, 22, 28), *G. quadratum* zusammenschließende, mehr vieleckige (Abb. 3). Die Ähnlichkeit zwischen *G. quadratum* und *G. multicoccum* erstreckt sich, außer auf das Auftreten von Kolonien mit 8 und 16 Zellen, auch auf die Geißeln, die bei beiden Arten meist 3mal so lang sind wie die Zellen, während sie bei *G. octonarium* wie bei *G. pectorale* nur 2mal so lang sind wie die Zellen. Unterschiede bestehen aber darin, daß 1. *G. multicoccum* 32zellige Kolonien bildet, die bei *G. quadratum* nicht vorkommen, 2. *G. multicoccum* mehrere Pyrenoide in jeder Zelle hat, *G. quadratum* aber immer nur eins, und 3., daß die Kolonien von *G. multicoccum* nur selten einen annähernd quadratischen Umriß haben. Bei den 8zelligen Kolonien liegt meist eine der Zellen zentral (Pocock 1955, Fig. 23—25), und die 16zelligen haben einen ungefähr rautenförmigen Umriß, nicht einen quadratischen mit abgerundeten Ecken wie bei *G. quadratum*.

Bei allen Arten sind die schwimmenden, plattenförmigen Kolonien fast eben. FRITSCH (1935) beschreibt sie für *G. pectorale* als leicht gewölbt.

IV. Diagnose

Gonium quadratum n. sp.

Gewöhnlich 8zellig. Bei guter Ernährung kommen auch 16zellige Coenobien vor, außerdem einige 4zellige. Alle sind von einer Gallertschicht umgeben.

Die quadratische Gestalt der Coenobien kommt dadurch zustande, daß 4 Zellen kreuzförmig angeordnet sind und 4 andere die Zwischenräume ausfüllen.

Die Zellen gleichen denen anderer *Gonium*-Arten, haben aber längere Geißeln.

Die Art ist mixotroph und vermehrt sich im Dunkeln.

Herkunft: Gartenbeet in Klausen, Südtirol.

Literatur

- FRITSCH, F. E.: The Structure and Reproduction of the Algae, Vol. I. Cambridge: 1935. — IYENGAR, M. O. P.: Chlorophyta. Manual of Phycology, Waltham, Mass.: ed. G. M. Smith 1951. — PASCHER, A.: Volvocales-Phytomonadinae. Süßwasserflora, Heft 4, 1927. — POCK, M. A.: Volvox in South Africa. Ann. South African Museum, 16, 523—646 (1933). — Studies in North American Volvocales. I The Genus *Gonium*. Madrono 13, 49—64 (1955). — PRINGSHEIM, E. G.: Beiträge zur Physiologie saprophytischer Algen und Flagellaten, I. Mitt. Chlorogonium und Hyalogonium. Planta 26, 631—664 (1937). — SCHREIBER, E.: Zur Kenntnis der Physiologie und Sexualität höherer Volvocales. Z. Bot. 17, 336—376 (1925). — STEIN, J. R.: A morphological study of *Astrophoneme gubernaculifera* and *Volulina steinii*. Amer. Jour. Bot. 45, 388—397 (1958).

Autorenverzeichnis

- ALLEN, MARY BELLE, Studies with *Cyanidium caldarium*, an anomalously pigmented chlorophyte. S. 270
- BAHADUR, K., and J. N. DUBE, Study of 2,3-Butanediol Formation by *Serratia marcescens*. S. 16
- , and S. RANGANAYAKI, A study of the influence of zinc ions on the production of 2,3-Butanediol by *Pichia indica*. S. 309
- , —, The Influence of Iron, Sulphite and Paraformaldehyde on the Formation of 2,3-Butanediol in the Cultures of *Bacillus polymyxa*. S. 369
- BLASCHKE-HELLMESSEN, RENATE, Über die antagonistische Wirkung aerober Sporenbildner gegenüber pathogenen Hautpilzen. S. 393
- BÜNNING, E., und INGEBORG GÖSSEL, Ergänzende Versuche über die phototaktischen Aktionsspektren von *Euglena*. S. 319
- DUBE, J. N., s. BAHADUR, K. S. 16
- ECKSTEIN, B., Karyologische Untersuchungen an einer Wildhefe. S. 65
- FROMMER, W., Zur Systematik der Actinomycin bildenden Streptomyceten. S. 187
- GAERTNER, A., Versuche zur künstlichen Kultur von *Phytophthora infestans* de Bary. I. Bedarf und Wirkung einiger anorganischer Salze im Nährmedium. S. 261
- GALLWITZ-UEBELMESSER, E., s. HARDER, R. S. 115
- GILLISSEN, G., und E. HEUSEL, Der Einfluß von Antibiotica auf die Überlebensrate von Mikroorganismen bei tiefen Temperaturen. S. 361
- GÖSSEL, INGEBORG, s. BÜNNING, E. S. 319
- HALBSGUTH, W., und H. RUDOLPH, Untersuchungen über die Wärmeaktivierung der Sporangiosporen von *Phycomyces blakesleeanus*. I. S. 296
- HARDER, R., und E. GALLWITZ-UEBELMESSER, Über niedere Erdphycomyceten Australiens. S. 115
- HEUSEL, E., s. GILLISSEN, G. S. 361
- KAPLAN, R. W., Studien über die UV-Mutabilität verschiedener Stämme von *Serratia* und über die Natur der Färbungsmutationen. S. 138
- KATING, H., Über das Amidspaltungsvermögen von *Endomycopsis vermalis*, *Torulopsis utilis* und *Willia anomala*. S. 207
- LEEDALE, G. F., Nuclear structure and Mitosis in the *Euglenineae*. S. 32
- , The Time-Scale of Mitosis in the *Euglenineae*. S. 352
- LINDE, K., Über ein symbiotisches Phänomen zwischen ammonverarbeitenden Darmbakterien und einem apathogenen gramnegativen Bakterium in synthetischer Nährlösung. S. 234
- , Chemische Ursachen einer Symbiose zwischen ammonverarbeitenden Darmbakterien mit einem unbekannten gramnegativen Bakterium in synthetischer Nährlösung. S. 243
- OTTO, G., Beitrag zur Frage der funktionellen Bedeutung der Vesikel der endotrophen *Mycorrhiza* an Sämlingen von *Malus communis* L. S. 373
- PAUL, H. L., und L. QUANTZ, Über den Wechsel der Konzentration des echten Ackerbohnenmosaikvirus in Ackerbohnen. S. 312
- , Spektralphotometrische Untersuchungen am Kartoffel-X-Virus. S. 416

- PERSIEL, INGETRAUD, Über Phlyctochytrium reinboldtae n. sp. S. 411
- PRÄVE, P., Stoffwechsel und Actinomycinbildung von Streptomyceten. S. 278
- Citronensäurecyclus und Actinomycinbildung. S. 286
- PRINGSHEIM, E. G., Kleine Mitteilungen über Flagellaten und Algen. V. Gonium quadratum nov. sp. S. 429
- PROCTOR, M. H., and P. W. WILSON, Nitrogen fixation by Achromobacter spp. S. 254
- QUANTZ, L., s. PAUL, H. L. S. 312
- RADLER, F., Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. II. Der Nähr- und Wuchsstoffbedarf der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien S. 1
- RANGANAYAKI, S., s. BAHADUR, K. S. 309 und 369
- RAU, W., und C. ZEHENDER, Die Carotinoide von Fusarium aquaeductum Lagh. S. 423
- ROSEMBERG, J. A., Qualche ricerca intorno a Pichia fermentans Lodder. S. 346
- RUDOLPH, H., s. HALBSGUTH, W. S. 296
- SANTA MARIA, J., Sporobolomyces marcellae nov. spec., isolated from the air. S. 29
- SCHMIDT, H. L., Beitrag zur Ermittlung der Pilzbesiedelung bei natürlichen Böden und ihrer Kennzeichnung durch ein besonderes Isolierungsverfahren. S. 224
- SCHRADER, R., Untersuchungen zur Biologie der Erbsenmycorrhiza. S. 81
- SCHWEIGHOFER, D., und P. STARLINGER, Zur Protoplastierung von E.coli B mit Lysozym und Versen. S. 219
- STARLINGER, P., s. SCHWEIGHOFER, D. S. 219
- TOLEDO, O. Z. DE, s. VERONA, O. S. 25
- TOTH, L. Z. J., The Sterilizing Effect of Ethylene Oxide Vapor on Different Micro-Organisms. S. 409
- TROLLDENIER, G., Polyploidie und Knöllchenbildung bei Leguminosen. S. 328
- UNGER, H., 2,3,5-Triphenyl-Tetrazoliumsalz als Hilfsmittel bei der Keimzählung nach dem Kochschen Gußplatten-Verfahren. S. 20
- VERONA, O., e O. Z. DE TOLEDO, Reisolamento di una rara specie di Lievito: Trigonopsis variabilis Schachner. S. 25
- WAHLIG, H., Properdin-System und Antikörperbildung. I. Der Serum-Properdinspiegel von Kaninchen während der Immunisierung mit Mycobacterium tuberculosis. S. 127
- , Properdin-System und Antikörperbildung. II. Der Serum-Properdinspiegel von Kaninchen während der Immunisierung mit Salmonella typhosa. S. 322
- WILSON, P. W., s. PROCTOR, M. H. S. 254
- WINKLER, U., Qualitative und quantitative Experimente über Transduktion mit neu isolierten Salmonellaphagen. S. 161
- ZEHENDER, C., s. RAU, W. S. 423

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photos. Vorlagen für Diagramme sind in etwa doppelter Reproduktionsgröße erwünscht.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Selbständige kritische Sammelreferate über einzelne Gebiete sind erwünscht.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Ergebnisse der Biologie

Herausgegeben von H. Autrum, E. Bünning, K. v. Frisch, E. Hadorn, A. Kühn, E. Mayr, A. Pirson, J. Straub, H. Stubbe, W. Weidel. Redigiert von H. Autrum.

Einundzwanzigster Band: Mit 42 Abbildungen. IV, 226 Seiten Gr.-8°. 1959.

DM 30,—

Inhaltsübersicht: Die Nitratreduktion grüner Pflanzen. Von E. Kessler, Marburg a. d. Lahn. — Die Orientierung nach der Schwingungsrichtung linear polarisierten Lichtes und ihre sinnesphysiologischen Grundlagen. Von K. Stockhammer, München. — Über die Beteiligung von Sulfhydrylen an biologischen Prozessen. Von G. Cleffmann, Marburg a. d. Lahn. — Der Feinbau der Organoide von *Amoeba proteus* und seine Beeinflussung durch verschiedene Fixierstoffe. Von F. E. Lehmann, Bern, Schweiz. — The Ultrastructure of the Retinal Receptors of the Vertebrate Eye. By F. S. Sjöstrand, Stockholm, Sweden. — Die Lageorientierung mit Statolithenorganen und Augen. Von H. Schöne, Seewiesen über Starnberg/Obb. — Namen- und Sachverzeichnis.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Heidelberger Jahrbücher

Herausgegeben von der Universitäts-Gesellschaft Heidelberg. Jährlich erscheint ein Band.

Band I: Mit 23 Abbildungen. VIII, 181 Seiten Gr.-8°. 1957.

Englische Broschur DM 18,—

Inhaltsübersicht: Aufsätze: Das Wesen der Rezeption des römischen Rechts. Von Wolfgang Kunkel. — **Probleme der Weistumsforschung.** Von Karl Kollnig. — **Das mittelalterliche deutsche Epos und die Musik.** Von Ewald Jammers. — **Ein Brief Wilhelm v. Humboldts an Schiller.** Von Arndt Schreiber†. — **Beiträge zur Physiognomik des 16. und 17. Jahrhunderts.** I. Bildnisse des Kaisers Karl V. II. Die Gegenwärtigkeit des Frans Hals. Von Georg Poensgen. — **Die Heidelberger Karmelitenkirche St. Jacobus Major.** Von Peter Anselm Riedl. — **Bibliographie: Schriften-Verzeichnis der Heidelberger Dozenten. Veröffentlichungen aus den Jahren 1953—1956.** Theologische, Juristische, Philosophische Fakultät und Dolmetscher-Institut.

Band II: Mit 10 Abbildungen. VIII, 192 Seiten Gr.-8°. 1958.

Englische Broschur DM 18,—

Inhaltsübersicht: Aufsätze: Emanzipation und Staat im frührevolutionären Deutschland vor 1848. Von Werner Conze. — **Das Hambacher Fest und der südwestdeutsche Frühliberalismus.** Von Fritz Trautz. — **Die Grundlagen der völkerrechtlichen Ordnung nach den spanischen Völkerrechtsklassikern.** Von Antonio Truyol y Serra. — **Der Prudentia-Teppich des Pfalzgrafen Ottheinrich im Kurpfälzischen Museum zu Heidelberg.** Von Annelise Stemper. — **Die beiden Fassungen von Flauberts Education sentimentale.** Von Hans Robert Jauss. — **Bibliographie: Schriften-Verzeichnis der Heidelberger Dozenten. Veröffentlichungen aus den Jahren 1953—1956.** Medizinische Fakultät. Naturwissenschaftlich-Mathematische Fakultät.

SPRINGER-VERLAG·BERLIN·GÖTTINGEN·HEIDELBERG